



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

LUIS ANTONIO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA
(EAEC) ISOLADAS DE CRIANÇAS COM GASTROENTERITE AGUDA NA
REGIÃO DE PORTO VELHO-RO**

PORTO VELHO
2014



Universidade Federal de Rondônia



Núcleo de Saúde

Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental

DEFESA DE MESTRADO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

A sessão pública de apresentação oral do aluno **Luís Antônio da Silva**, para defesa de dissertação de mestrado Trabalho de Pesquisa intitulado: "**Caracterização das cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) isoladas de crianças com gastroenterite aguda na região de Porto Velho – RO**", do Curso de Mestrado em Biologia Experimental, realizou-se no dia 03/07/2014, às 14h30min, no Auditório do PPGBIOEXP, sendo nomeada para avaliação a banca examinadora assim constituída:

Membros Titulares da Banca Examinadora:

1. Dra. Najla Benevides Matos (Titular interno – FIOCRUZ, Rondônia)
2. Dra. Joana D'arc Neves Costa (Titular – FIOCRUZ, Rondônia)
3. Dra. Cleoni Mendes de Lima (Titular externo – FIOCRUZ, Rondônia)

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação considerou o candidato:

(X) Aprovado

() Reprovado

1) Presidente Najla Benevides Matos

2) Examinadora 2 _____

3) Examinadora 3 _____

Porto Velho, ____ / ____ / ____

LUIS ANTONIO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA
(EAEC) ISOLADAS DE CRIANÇAS COM GASTROENTERITE AGUDA NA
REGIÃO DE PORTO VELHO-RO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental PGBIOEXP da Universidade Federal de Rondônia - UNIR para obtenção do Título de Mestre em biologia.

**Porto Velho – RO
2014**

LUIS ANTONIO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA
(EAEC) ISOLADAS DE CRIANÇAS COM GASTROENTERITE AGUDA NA
REGIÃO DE PORTO VELHO-RO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental PGBIOEXP da Universidade Federal de Rondônia UNIR para obtenção do Título de Mestre em biologia.

Área de concentração: Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Dra. Najla Benevides Matos

**Porto Velho – RO
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA CENTRAL PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

S856c

Silva, Luis Antonio da.

Caracterização das cepas de Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) isoladas de crianças com gastroenterite aguda na região de Porto Velho – RO. / Luis Anonio da Silva. Porto Velho, 2014.

72f.: il.

Orientadora: Najla Benevides Matos

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Fundação Universidade Federal de Rondônia. Porto Velho, Rondônia, 2014.

1. Diarréia. 2. Escherichia coli enteroagregativa. 3. Genes de virulência. 4. Caracterização Fenotípica. 5. Caracterização Genotípica. I. Fundação Universidade Federal de Rondônia. II. Título.

CDU:

Bibliotecária responsável: Eliane Gemaque – CRB-11/549

AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de microbiologia do Centro de Pesquisas em Medicina Tropical pelo inestimável auxílio e convivência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro.

Aos amigos e professores pela dedicação e incentivo, convívio e amizade: Dra. Najla Benevides Matos, Dr. Alexandre e Dr. Mauro Tada, Núcia Cristiane, Renata, Érica, Alessandra, Aldilene, Fátima, Esquerdo, Íris, Jaqueline e Sandra, Ronelson e Ângela, Antonio e Luan, Rose e Flaviani, Nair, Odair e Mariluci, aos doutores Cléber de Freitas e Dr. Fábio da Silva Barbieri do PPG-Bionorte.

Bem como a minha mãe Iracema e minha irmã Lúcia de Fátima pelo incentivo, mesmo que de longe e finalmente, um agradecimento a minha filha Olívia pela paciência nos momentos de dificuldade.

Um muito obrigado a todos.

RESUMO

SILVA, L.A. CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA (EAEC) ISOLADAS DE CRIANÇAS COM GASTROENTERITE AGUDA NA REGIÃO DE PORTO VELHO-RO. 2014.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Centro de Pesquisas Médicas, Universidade federal de Rondônia – UNIR. Porto Velho, Rondônia, RO. 2014.

A bactéria denominada *Escherichia coli* diarreiogênica é considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A espécie *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) é um patógeno emergente causador da diarreia aguda tanto em crianças quanto em adultos. EAEC caracteriza-se por apresentar-se nos testes de adesão em células HEP-2 como um agregado de células bacterianas unidas, perfazendo um aglomerado semelhante a “tijolos empilhados” daí a sua descrição como “aderência agregativa”. O objetivo deste estudo foi caracterizar fenotipicamente e genotipicamente, as amostras de EAEC isoladas de crianças com gastroenterite aguda na região de Porto Velho – Rondônia. As amostras foram coletadas no Hospital Infantil Cosme e Damião (HICD) no período de fevereiro de 2010 a fevereiro de 2012. Os resultados mostraram uma alta frequência de resistência aos antimicrobianos ampicilina (64,8%), trimetropim-sulfametoxazol (54,6%) e tetraciclina (45,37%). Detecção fenotípica da β -lactamase de espectro estendido (ESBL) apareceu em 16,6% das amostras. Os genes codificadores de ESBL do tipo TEM e CTX foram encontrados em 24,07% e 12,03% respectivamente. Os genes de virulência mais frequentes foram *irp2* (71,30%), *astA* (62,96%) e *aggR* (48,15%). Quanto à capacidade de formação de biofilme o fenótipo fortemente aderente aparece em 43,52% das amostras e fracamente aderente em 36,11%. O teste de aderência agregativa aparece em 48,15% das cepas. Quanto ao teste de hemólise, o perfil alfa-hemolítico foi o fenótipo mais frequentemente isolado com 51,85%. Diante destes dados, pesquisas complementares deverão ser realizadas para determinação do perfil epidemiológico das *E. coli* no estado de Rondônia.

Palavras-chave: Diarreia, *Escherichia coli* enteroagregativa, Genes de virulência, Biofilme, Hemólise, Antibiógrama.

ABSTRACT

SILVA, L.A. **CHARACTERIZATION OF THE STRAINS OF ENTEROAGREGGATIVE *Escherichia coli* (CEEA) ISOLATED IN CHILDREN WITH ACUTE GASTROENTERITIS IN THE REGION OF PORTO VELHO-RO. 2014.** Dissertation (Master Degree in Microbiology) – Medical Research Center, Universidade Federal de Rondônia – UNIR. Porto Velho, Rondônia. 2014.

Enterοaggregative *Escherichia coli* is an emerging pathogen that causes acute diarrhea in children and adults in developing countries and also in developed countries. The bacteria denominated *Escherichia coli* diarrheagenic is considered one of the main causes of morbidity and mortality all over the world. It is characterized by presenting itself in the adhesion tests in cells Hep-2 as an aggregate of united bacterial cells, forming an aggregate similar to “stacked bricks”, what explains its description as an “aggregative adherence”, The aim of this study was to describe the phenotype and genotype characteristics of the samples of Enterοaggregative *E. coli* isolated from children with acute gastroenteritis in the region of Porto Velho – Rondônia. The samples were collected at Hospital Infantil Cosme e Damião (HICD), in the period from February 2010 to February 2012. The results showed a high frequency of resistance to the antimicrobials ampicillin (64, 8%), Trimethoprim-Sulfamethoxazole (54,6%) tetracycline (45,37%). Phenotypic detection of the enzyme ESBL (extended-spectrum beta-lactamases) appeared in 16,6% of the samples. The genes of resistance *tem* and *ctx* were found in 24,07% and 12, 03%, respectively. The virulence genes more frequents were *irp2* (71,30%), *asta* (62,96%) and *aggr* (48,15%). In terms of capacity of formation of biofilm the phenotype strongly adherent appears in 43,52% of the samples and weakly adherent in 36,11%. The test of aggregative adherence appears in 48, 15% of the strains. Finally the hemolysis test presented the alpha-hemolysis as the most frequent phenotype in 51, 85%. We have seen that the results confirm previous researches that indicate attention in the cases of manifestation of the pathogens and their resistance. Given these data, further research should be undertaken to determine the epidemiology of *E. coli* in the state of Rondônia.

Key Words: Diarrhea, Entereoaggregative *Escherichia coli*, Virulence Genes, Biofilm, Hemolysis, Antibioqram.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA.....	aderência agregativa
Aafa.....	gene que transcreve a fimbria de aderência agregativa tipo II (AAF/II).....
(AAF/II).....	adesina afímbral
AD.....	aderência difusa
Afa-1.. ..	gene de virulência
Agga.....	gene que transcreve a fimbria de aderência agregativa tipo I (AAF/I)
AggR.....	gene ativador transcricional de AAF/I e AAF/II virulência
Agg3.....	gene ativador da fimbria de aderência agregativa tipo III (AAF/III)
AL.....	aderência localizada
AMPC.....	monofosfato cíclico de adenosina
Asta.....	Toxina termoestável agregativa EAST-1
^{bla} -TEM.....	ESBL do tipo TEM
^{bla} -CTX-M..	ESBL do tipo CTX-M
CEPEM.....	Centro de Pesquisa em Medicina Tropical
<i>C. freundii</i> ..	<i>Citrobacter freundii</i>
CLSI	Manual Clinical and Laboratory Standards Institute
DAEC....	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DMEM.....	meio EAGLE modificado por Dulbecco
DNA.....	ácido desoxirribonucléico
EAEC.....	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAST.....	Heat-stable enterotoxin
EDTA.....	ácido etileno diamino tetracético
EHEC.....	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC.....	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC.....	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica

ESBL.....betalactamase de espectro estendido

ETEC.....*Escherichia coli* enterotoxigênica

fliC.....flagelina

GM-CSF..fator estimulador de colônias de granulócitos macrófagos

Gro- αgene de crescimento

Gro- βgene de crescimento

HEp-2Célula de carcinoma de laringe humana

HlyE.....hemolisina

ICAM-1.....molécula de adesão intercelular

IL.....interleucina

INF- γinterferon gama

Irp2.....gene de virulência, sideróforo de ferro

MAPK.....mitógeno ativador da proteína quinase

NF-KB.....fator nuclear kappa B

pAA.....plasmídeo de aderência agregativa – dispersina

PBS...Tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline

Pet.....gene de virulência, plasmid encoded toxin

Picgene de virulência, protein involved in intestinal colonization

SDS.....dodecil sulfato de Sódio

Set1A.....gene de virulência, shigella enterotoxina 1

SFB.....soro fetal bovino

ShET1.....Shigella enterotoxin 1

Shf.....gene de virulência formador de biofilme

Stacked Bricks..tijolos empilhados, tipo de adesão celular

TBE.....tampão Tris borato com EDTA

TLR-5.....receptor toll-like 5

TNF.....fator de necrose tumoral

TSA.....teste de sensibilidade aos antimicrobianos

UFC.....unidade formadora de colônia

χ^2 teste do Qui-quadrado

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mecanismos de infecção de <i>E.coli</i> diarreio gênicas. EPEC, EHEC, ETEC, EAEC, EIEC e DAEC.	15
Figura 2: As 3 etapas da patogênese por EAEC.....	17
Figura 3: Adesão agregativa de EAEC na mucosa intestinal - microscopia.....	19
Figura 4: Representação esquemática de diferentes estados de desenvolvimento de um biofilme.....	22
Figura 5: Organização genética dos genes <i>pic/set1A</i> de EAEC cepa O42..	23
Figura 6: Teste fenotípico de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) em ágar Muller-Hinton de um dos isolados de EAEC.....	46
Figura 7: Teste de betalactamase de espectro estendido (ESBL).	47
Figura 8: Teste confirmatório para a produção da enzima β -lactamase por controle positivo.	47
Figura 9: Resultados dos testes fenotípicos na detecção de ESBL de resistência. .	48
Figura 10: Amplificação dos genes codificadores de ESBL do tipo ^{bla} CTX em isolados de EAEC... ..	49
Figura 11: Associação de fenótipo ESBL e genes de resistência.	52
Figura 12: Gel de agarose mostrando os 7 genes de virulência nos isolados de EAEC.	53
Figura 13: Resultado do teste de formação de biofilme por espectrofotometria.....	54
Figura 14: Teste de formação de biofilme em isolados de EAEC	55
Figura 15: Resultado de teste de aderência agregativa.	56
Figura 16: Aderência difusa, controle (-)	58
Figura 17: Resultado fenotípico de aderência agregativa.....	56
Figura 18: Alfa hemólise das amostras 146, 147 e 148.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Posição no ranking da taxa de Internação hospitalar de pacientes com diarreia.	27
Tabela 2- Diâmetro do halo de inibição para cada classe de antibiótico testado	33
Tabela 3- Diâmetro dos halos de inibição aos antibióticos β -lactâmicos para detecção de ESBL.....	35
Tabela 4- Sequência de primers que codificam genes de virulência usados nesse estudo.	36
Tabela 5- Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de EAEC	45
Tabela 6- Resultados da resistência e sensibilidade aos antimicrobianos.	46
Tabela 7- Apresentação da presença dos genes de ESBL do tipo <i>bla_{tem}</i> e <i>bla_{ctx-m}</i>	49
Tabela 8- Associação entre o fenótipo de ESBL versus genes de ESBL do tipo TEM e CTX.	50
Tabela 9- Pesquisa dos genes de virulência em amostras de <i>E.coli</i> diarreiogênicas.	51
Tabela 10- Correlação dos genes de virulência em EAEC.	52
Tabela 11- Associação entre formação de biofilme e presença de genes de virulência em isolados de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa.	55
Tabela 12- Associação entre aderência celular e fatores de virulência.	57
Tabela 13- Resultado do teste de hemólise dos isolados de EAEC.	57

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 EAEC.....	16
1.2 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE DE EAEC	16
1.2.1 ADESÃO CELULAR.....	18
1.2.2 PRODUÇÃO DE MUÇO.....	20
1.2.3 PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS E CITOTOXINAS.....	22
1.2.4 INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO DA MUCOSA	24
1.3 ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	24
1.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	26
1.5 DIARRÉIA EM RONDÔNIA.....	27
2. OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	30
3.2 LOCAL DO ESTUDO	30
3.3 ASPECTOS ÉTICOS.....	30
3.4 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.....	31
3.5 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	31
3.6 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)	32
3.7 TESTES DE SENSIBILIDADE PARA DETECÇÃO DE ESBL.....	34
3.8 DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	35
3.9 TESTE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	36
3.10 TESTES DE HEMÓLISE	38

3.11 ENSAIOS DE ADESÃO EM CÉLULAS	39
3.11.1 CULTIVO DE CÉLULAS HEP-2	39
3.11.2 PREPARO DAS PLACAS PARA O ENSAIO DE CITOADERÊNCIA	39
3.11.3 PREPARO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS	40
3.11.4 REALIZAÇÃO DO TESTE DE ADESÃO EM CÉLULAS HEP-2	40
3.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
4.0 RESULTADOS	44
4.1 PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	44
4.2 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE BETALACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL).....	46
4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE GENES DE RESISTÊNCIA COM PRODUÇÃO DA ENZIMA BETA LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO.....	50
4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE FENÓTIPO ESBL E GENES ESBL DO TIPO <i>bla_{tem}</i> e <i>bla_{ctx-m}</i>	50
4.5 PESQUISA MOLECULAR DE GENES DE VIRULÊNCIA EM EAEC.....	50
4.6 ASSOCIAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA EM EAEC	52
4.7 DETECÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME	53
4.8 ASSOCIAÇÃO ENTRE BIOFILME E A PRESENÇA DE GENES DE VIRULÊNCIA.....	54
4.9 TESTE DE ADERÊNCIA CELULAR	55
4.10 ASSOCIAÇÃO ENTRE ADERÊNCIA CELULAR E FATORES DE VIRULÊNCIA	56
4.11 TESTE DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS ISOLADOS DE EAEC	57
5 DISCUSSÃO	59
REFERÊNCIAS.....	66
ANEXOS	76
APÊNDICE.....	83

1. INTRODUÇÃO

A diarreia infecciosa tem sido considerada como uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil (TORNIEPORTH; JOHN; SALGADO; DE JESUS; LATHAM, 1995). As manifestações clínicas destas infecções são variáveis em características e severidade, estando relacionadas com o estado imunológico do indivíduo e com a natureza do agente etiológico (THEA; KEUSCH, 1993).

No que tange a morbimortalidade, a síndrome diarreica aguda apresenta no Brasil, diferente perfil epidemiológico, segundo a população e a região estudada.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a diarreia é a segunda principal causa de morte entre crianças abaixo dos cinco anos de idade, sendo responsável pela morte de aproximadamente 760.000 crianças a cada ano, ocorrendo cerca de 1.7 bilhões de casos de diarreia por ano (OMS, 2013).

Embora haja registro de redução da mortalidade global desde o início da década de 1980, determinada pelo advento dos programas de controle das doenças diarreicas fundamentados na terapia de reidratação oral, ainda se observam altas taxas de morbidade e mortalidade infantil pela diarreia aguda e se impõe a adoção de medidas eficazes no combate da síndrome diarreica aguda (CAMPOS et al., 1995).

Entre os grupos de microrganismos, a bactéria *Escherichia coli* (*E.coli*) tem sido descrita como um importante agente etiológico dessa síndrome, tanto em crianças como em adultos (ALBERT et al., 1995; GOMES et al., 1991).

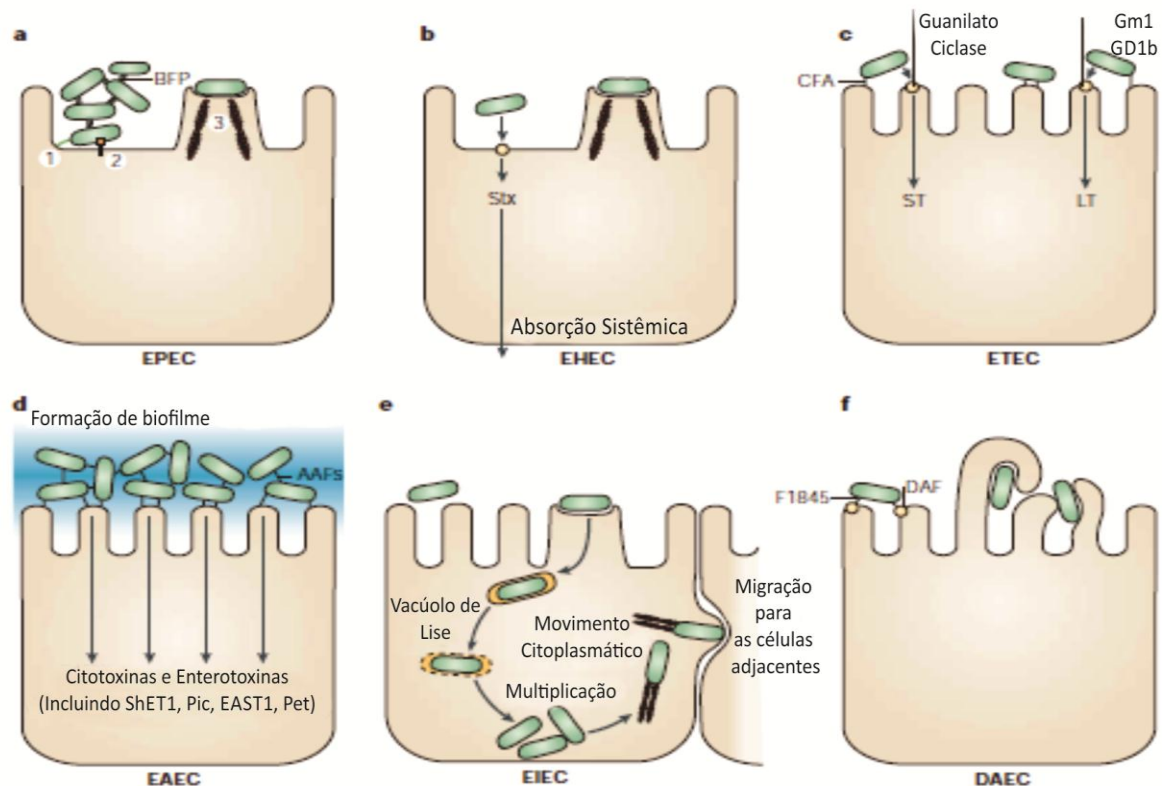
A *E. coli* é um bacilo gram negativo, anaeróbio facultativo, que apresenta cepas móveis ou imóveis. É um membro da família *Enterobacteriaceae*, gênero *Escherichia*, tendo sido descrita pela primeira vez por Theodore Escherich em 1885, que a denominou de *Bacterium coli commune*, indicando a ocorrência universal desta bactéria no intestino de indivíduos saudáveis (NATARO, 1995; KAPER, 2004).

A *E. coli* faz parte da microbiota de muitos animais e humanos, tipicamente coloniza o trato gastrointestinal de humanos poucas horas após o nascimento (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). As cepas comensais raramente causam doença, e geralmente coexistem bem em indivíduos saudáveis, exceto em hospedeiros debilitados ou imunocomprometidos, ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004); (NATARO, 1995); (KAPER, 1998).

Embora seja considerada uma habitante natural da flora intestinal, algumas cepas de *E. coli* têm adquirido fatores de virulência específicos que lhes conferem a capacidade de se adaptar a novos nichos e se tornar um patógeno altamente adaptado capaz de causar um amplo espectro de doenças, de gastroenterite a infecções extra-intestinais (CROXEN; FINLAY, 2010); (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As bactérias denominadas *E. coli* diarreio gênicas são consideradas uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (NATARO; MOBLEY, 2004). Atualmente oito categorias patotípicas distintas de *E. coli* tem sido descritas, as quais são classificadas em *E. coli* diarreio gênicas (DEC) ou *E. coli* extra-intestinal (ExPEC). Dois patótipos são extra-intestinais, a *E. coli* uropatogênica (UPEC) e a *E. coli* causadora de meningite neonatal (NMEC), enquanto que as espécies de *E. coli* diarreio gênicas (DEC) são divididas em seis categorias, baseadas em seu mecanismo de patogenicidade e quadro clínico: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), Enterohemorrágica (EHEC), Enterotoxigênica (ETEC), Enteroinvasiva (EIEC), Enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC). (CROXEN; FINLAY, 2010); (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004); (VIDAL et al., 2007). (Figura 1).

Figura 1- Mecanismos de infecção de *E.coli* diarreiogênicas. EPEC, EHEC, ETEC, EAEC, EIEC e DAEC.



Fonte: (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Existem diferenças marcantes entre estas seis categorias de *E. coli* e suas respectivas infecções entéricas: a) EPEC difere das demais categorias que causam a diarreia pelo padrão de adesão AL associado com a produção da fímbria "bundle-forming pili" com função de agregar as bactérias; b) EHEC produzem casos de colite hemorrágica e a síndrome urêmica hemolítica e colonizam o intestino grosso causando lesão A/E, ocorre adesão por uma célula chamada intimina, estas bactérias também produzem citotoxinas Stx idênticas aquelas produzidas pela *Shigella dysenteriae* (Stx); c) As amostras de ETEC produzem duas enterotoxinas denominadas de termo-lábil (LT) e termo-estável (ST), as duas toxinas produzem aumento do AMPc pela ativação da adenilato ciclase resultando em desequilíbrio hidro-salino e conseqüente acúmulo de líquido na luz intestinal e diarreia aquosa; d) EAEC tem como característica seu padrão agregativo (AA) que dispõem as bactérias lado a lado como em tijolos empilhados; e) EIEC semelhante as bactérias do gênero *Shigella*, são capazes de invadir células superficiais e multiplicam-se nelas, a maioria dos genes necessários para o fenômeno de invasão está localizado

num plasmídio, como as *Shigellas* estas bactérias invadem as células do cólon, multiplicam-se interiormente e penetram nas células adjacentes causando morte celular e ulceração; f) DAEC *E. coli* que se adere difusamente é assim chamada devido ao tipo de adesão que realiza com as células HEp-2 e HeLa, padrão da presença de bactérias distribuídas por toda superfície celular.

Nesta pesquisa será enfatizada a descrição do patótipo EAEC, pois este faz parte do objetivo deste estudo.

1.1 EAEC

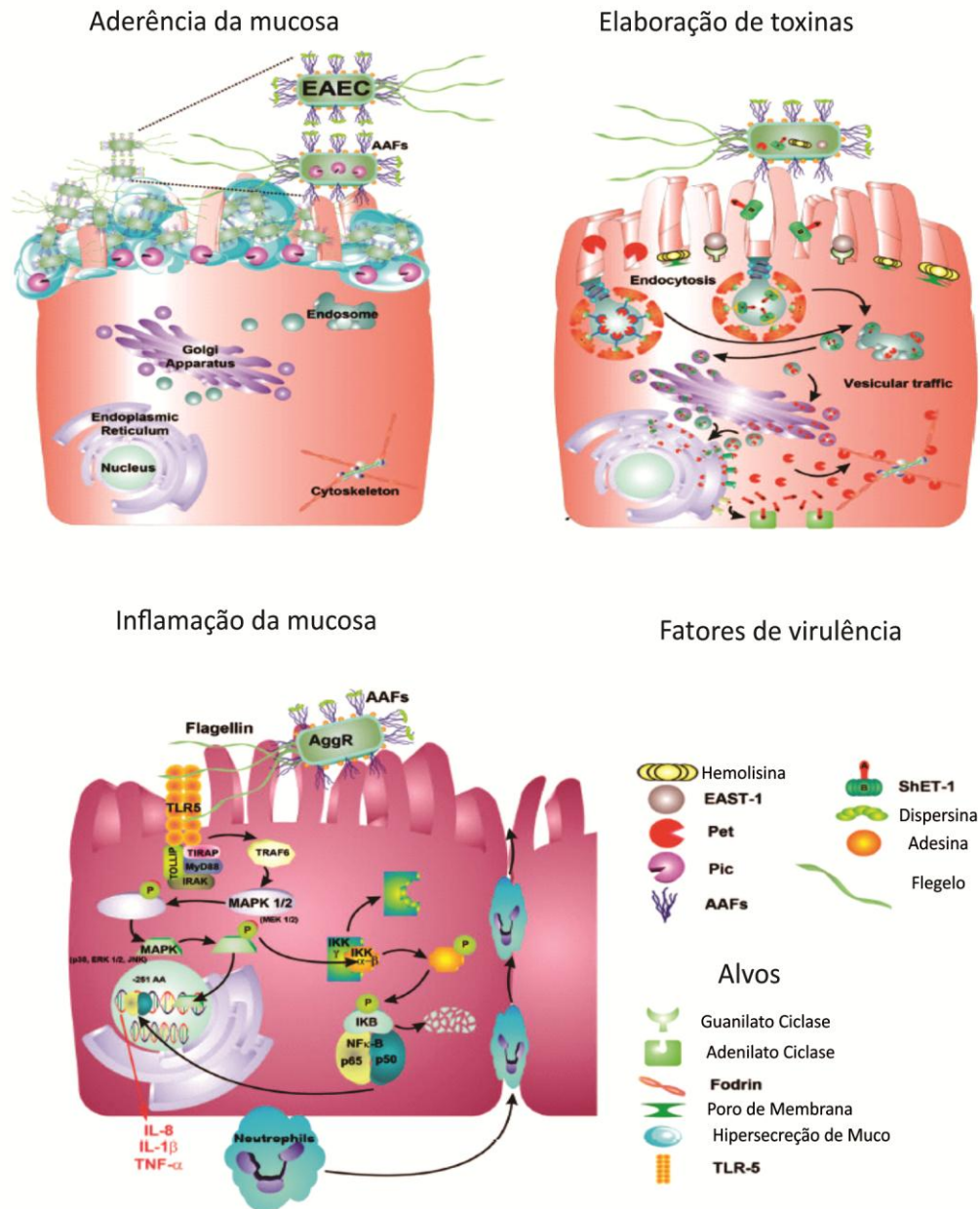
EAEC é uma bactéria Gram negativa causadora de diarreia em diversos grupos populacionais. Associada a diarreia infantil em países emergentes e em desenvolvimento. EAEC também causa diarreia em adultos e viajantes e tem sido a causa de surtos de origem alimentar em países industrializados (HARRINGTON et al., 2005).

Os estudos iniciais realizados em países emergentes com EAEC mostraram que esta bactéria foi relacionada com diarreia crônica e em alguns casos, persistente (VILLASECA et al., 2005). Estudos recentes têm mostrado que EAEC pode também ser associada com diarreia aguda, havendo surtos nosocomiais. EAEC tem sido mundialmente conhecida como um agente patogénico importante de doenças diarreicas em adultos que adquiriram o vírus HIV (VILLASECA et al., 2005).

1.2 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE DE EAEC

A patogênese por EAEC é descrita em um modelo de três estágios. Inicialmente ocorre uma adesão do microorganismo à mucosa do intestino delgado e grosso e o aumento da produção de muco (1), em seguida ocorre à elaboração de enterotoxinas, e citotoxinas promovendo a toxicidade das mucosas do trato gastrointestinal (2) e finalmente ocorre o processo inflamatório (3). (HUANG; MOHANTY; DUPONT; OKHUYSEN; CHIANG; 2004). (Figura 2).

Figura 2- As três etapas da patogênese por EAEC: (1) aderência abundante da mucosa intestinal; (2) elaboração de enterotoxinas e citotoxinas; e (3) indução da inflamação da mucosa intestinal.



Fonte: Adaptado de NAVARRO-GARCIA & ELIAS, 2011.

A patogênese da infecção por EAEC ainda não é compreendida em sua totalidade. As alterações celulares vistas em modelos animais e em ensaios *in vitro*, sugerem que as alterações na mucosa intestinal durante a infecção de EAEC estão associadas com fatores de adesão e de produção de toxinas. A lesão da mucosa foi associada com a produção e liberação de mediadores inflamatórios (citocinas), que também podem contribuir para a doença intestinal (VILLASECA et al., 2005).

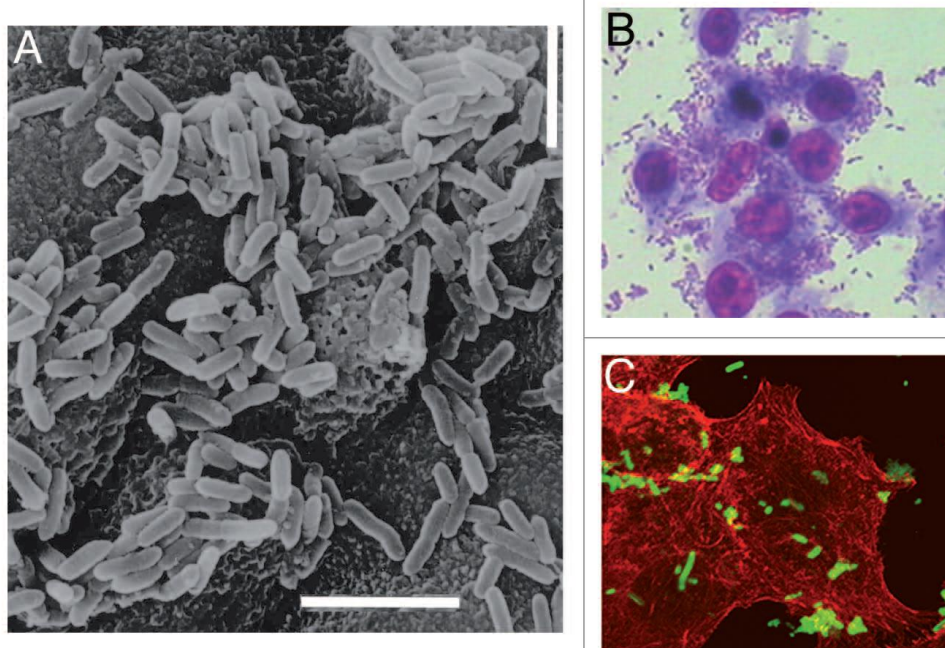
Em modelos animais e em pacientes infectados a EAEC coloniza variadas áreas do trato gastrointestinal sem lesões na mucosa do intestino delgado, onde existe abundante adesão e secreção de muco, mas realiza efeitos citotóxicos na mucosa do cólon intestinal (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2005). Essa produção intensa de muco pelos intestinos faz com que as bactérias fiquem retidas em uma densa camada de biofilme e muco (HARRINGTON, 2005). Acredita-se que a formação desse biofilme faz a bactéria colonizar e causar diarreia persistente devido à má absorção de nutrientes e eletrólitos (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). No cólon, EAEC induz mediadores inflamatórios e produz efeitos citotóxicos como vesiculação e diminuição das microvilosidades, aberturas de criptas aumentadas e aumento da extrusão de íons na célula epitelial (HARRINGTON, 2005).

Conforme a condição clínica da criança, tais como imunossupressão e desnutrição, a infecção pode permanecer assintomática ou desenvolver uma diarreia aguda ou persistente (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

1.2.1 ADESÃO CELULAR

A aderência à mucosa intestinal é um passo essencial na colonização e início da doença por EAEC (Figura 3) Czeczulin e colaboradores (1997) & Kaper em 2004 descreveram um padrão de adesão mediado por Fímbrias de Aderência Agregativa (AAFs) com a presença da proteína dispersina, caracterizada como formadora de uma camada frouxa ligada a membrana superficial das EAEC e desenvolvendo um forte efeito agregativo com as adesinas das AAFs, promovendo assim a reprodução celular e favorecendo a penetração através da mucosa intestinal (KAPER et al., 2004) (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

Figura 3- Adesão agregativa de EAEC na mucosa intestinal: (A) microscopia eletrônica de varredura de cepas O42; (B) microscopia de luz e (C) microscopia confocal de células epiteliais com cepas de *E. coli* O423 coradas com Giemsa.



Fonte: Navarro-Garcia & Elias, 2011.

Diferentes fímbrias têm sido observadas em EAEC em estudos de cepas utilizando microscopia eletrônica (KNUTTON et al., 1992) (SUZART et al., 2001). As fímbrias melhor caracterizadas são as AAFs: *Agga* (AAF/I), *Aafa* (AAF/II) e *Agg-3* (AAF/III), que são responsáveis pela expressão de AAFs e são codificadas em plasmídeos de elevado peso molecular (CLEMENTS; YOUNG; CONSTANTINOU, 2012). O gene *aafa* codifica para a fímbria AAF/II que permite a EAEC aderir à mucosa intestinal. AAF/III funciona como uma adesina e é codificada pelo gene *agg-3*. Estas fímbrias são membros da superfamília de adesinas, que inclui amostras de *E.coli* uropatogênica e diarreiogênica (HUANG et al., 2006).

O fator de virulência que temos maiores informações é o *aggR*, este gene de 308 pb está localizado no plasmídeo (pAAII) (HARRINGTON, 2005). O gene *aggR* é o ativador transcricional de AAF/I e AAF/II de EAEC e está relacionado com a expressão de múltiplos fatores de virulência, incluindo as fímbrias de adesão agregativa dispersina, o sistema de secreção do tipo I que é um dispositivo molecular que permitem a translocação de moléculas efetoras para o interior da célula hospedeira, necessário para transportar a dispersina até a superfície bacteriana (MORIN; SANTIAGO; ERNST, 2013). Estudos realizados por Sheikh,

2001 mostraram que o gene *aggR* regula a produção da *dispersina* que é uma proteína de anti-agregação (SHEIKH; HEIKH; HICKS; DALLÁGNOL; PHILLIPS; NATARO, 2001).

Este fenótipo está relacionado aos genes localizados em um plasmídeo denominado pAA (Plasmid Aggregative Adherence) onde está contido o regulador *aggR* que é capaz de controlar um grupo de genes plasmidiais e pelo menos duas ilhas de patogenicidade cromossômicas (MORIN et al., 2013). O critério que divide as cepas de EAEC em típicas e atípicas baseia-se na presença ou não dos genes de virulência *aggR* (TOKUDA et al., 2010).

Em relação às adesinas afimbriais estudos mostraram que o gene *afa-1* de 750 pb codifica para as adesinas afimbriais (Afas): AfaE-I; Afa-A, Afa-E, Afa-D, Afa-B e Afa-C que são expressos por diversas cepas de EAEC diarreiogênicas (SERVIN, 2005). Uma família de adesinas afimbriais Dr também chamadas de O75X é codificada pelo gene *Dra* (Dra antigen specific adhesin) (ANTÃO et al., 2009). Outras cepas de *E. coli* como as DAEC possuem também as adesinas Afa/Dr (WROBLEWSKA; SENIUK; SELVARAGAN, 2005). Estas espécies de *E. coli* são consideradas associadas a várias infecções entéricas e extra-intestinais como a infecção urinária (SERVIN, 2005).

1.2.2 PRODUÇÃO DE MUCO

Uma das etapas da patogênese por EAEC caracteriza-se pela produção de uma camada de muco na mucosa intestinal. Culturas de EAEC em modelos animais demonstraram que a bactéria sobrevive no interior de uma camada de muco, isso explica por que crianças em países em desenvolvimento e desnutridas desenvolvem fezes com muco devido à colonização prolongada e caracterizando a diarreia persistente (NATARO; KAPER, 1998).

Estudos realizados por Czeuczulin e colaboradores em 1999, mostraram a existência do gene plasmidial *Shf* de 613 pb que está envolvido com a característica de adesão agregativa e formação de biofilme em EAEC.

Para a formação de biofilme, inicialmente ocorre a adesão da bactéria à mucosa intestinal e/ou à camada de muco. As fímbrias seriam os principais candidatos e facilitadores desta colonização. Em seguida, inicia-se a produção

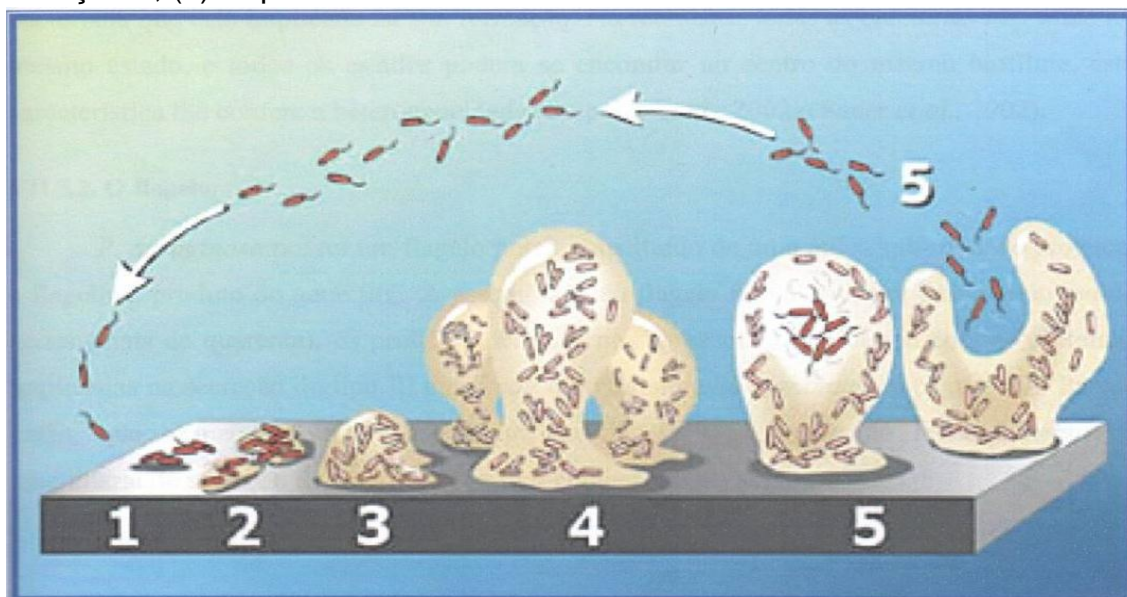
aumentada de muco, levando à formação de um biofilme, no qual as bactérias ficariam aderidas.

Diarreia por EAEC está vinculada a produção de diarreia mucóide com colonização maciça do trato gastrointestinal (HUANG; MOHANTY; DUPONT, 2004). Na infecção por EAEC ocorre a diminuição do desenvolvimento físico da criança devido à má absorção de nutrientes pelos intestinos como consequência da formação de intenso biofilme (HUANG; MOHANTY; DUPONT, 2004).

Este biofilme mucóide é formado quando a EAEC adere à mucosa intestinal produzindo um efeito tóxico sobre o epitélio que resultam em diarreia. Há a presença de adesinas, toxinas e vários outros fatores, produzindo anormalidades na absorção intestinal devido à formação de biofilme e tendo como consequência o prolongamento da diarreia (RITENBERG, 2012).

Após a adesão, colonização e multiplicação, as bactérias se cercam de substâncias poliméricas e recrutam mais células para as microcolônias e formam regiões intracelulares com canais cheios de líquido (MOHAMED et al., 2007). Devido à limitada penetração de agentes antimicrobianos e diminuição da taxa de crescimento e da expressão de genes de resistência em colônias de biofilme, a bactéria não é facilmente erradicada por antibióticos bactericidas e também pode ser protegida contra o ataque ao sistema imune intestinal, o que resulta em infecções prolongadas (MOHAMED et al., 2007). Os determinantes genéticos envolvidos na produção de biofilmes por EAEC apenas começaram a ser compreendidas. Vários fatores de virulência tais como os genes *agga*, *aggr* e *aap* (dispersina) são importantes na adesão de EAEC para a mucosa intestinal e em estimular a formação de biofilme. Além disso, demonstrou-se que o gene *fis* e *yafk*, através da ativação do gene *aggr*, também são importantes para a formação de biofilme (SHEIKH et al., 2001) (figura 4).

Figura 4: Representação esquemática de diferentes estados de desenvolvimento de um biofilme: (1) adesão inicial, (2) adesão irreversível, (3) maturação-1, (4) maturação-2, (5) dispersão do biofilme.



Fonte: Stoodley & Sauer *et al.*, 2002.

1.2.3 PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS E CITOTOXINAS

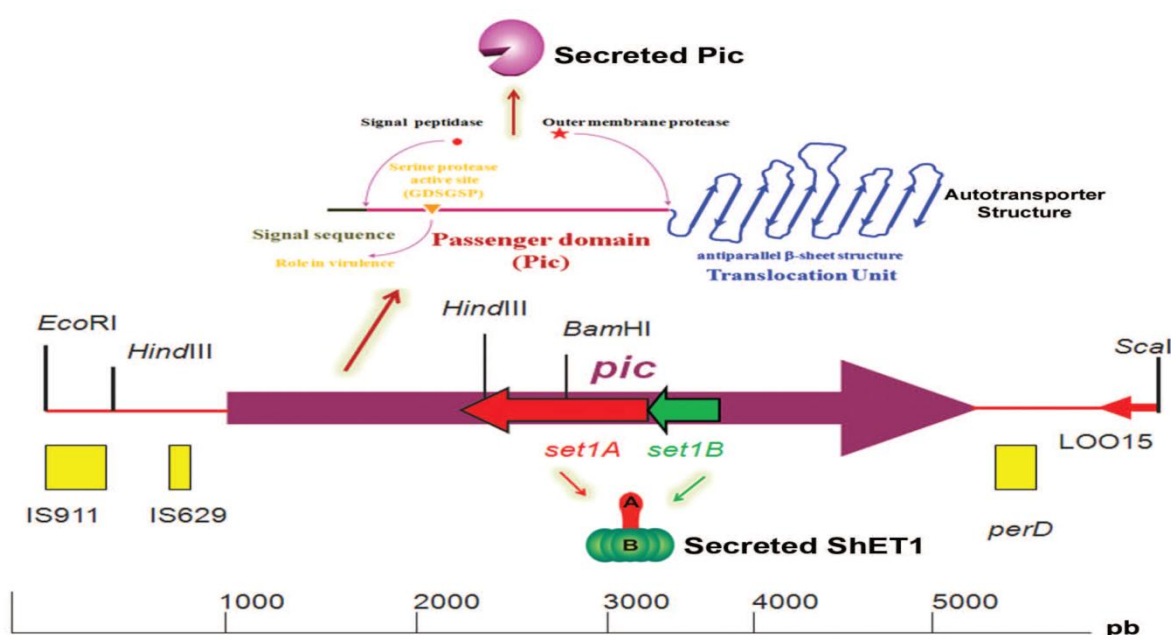
A patogênese por EAEC caracteriza-se pela liberação de toxinas nas mucosas. Várias toxinas já foram descritas e sabe-se que são a causa da destruição das microvilosidades intestinais e dos enterócitos (HUANG; MOHANTY; DUPONT, et al., 2004).

As amostras de EAEC são genotipicamente e fenotipicamente diferentes devido à presença de fibras AAF/I e/ou AAF/II e diversas toxinas. Descreveremos as três toxinas mais bem compreendidas que são: Pet (NAVARRO-GARCIA et al., 2001); EAST1 e ShET1 (BEHRENS; SHEIK; NATARO, 2002). A proteína Pet que pertence ao grupo de proteínas autotransportadoras, é uma serina protease de 104 KDa codificada por um plasmídeo de virulência. Estudos realizados mostraram que a toxina Pet atua nos epitélios diminuindo a resistência do jejuno de ratos, criando alterações no citoesqueleto, arredondamento em células HEP-2 e destruição da proteína espectrina (NATARO; KAPER, 1998); (NAVARRO-GARCIA et al., 2001).

Pet faz parte de um grupo de proteínas (toxinas) secretadas juntamente com duas outras toxinas, Pic ("Protein Involved in Intestinal Colonization") e Shet-1. Os genes *Pic* e *Set1A* são codificados pelo mesmo locus cromossômico em cadeias

opostas (HENDERSON et al., 1999). O gene *Pic* de 1.100 pb está envolvido com a colonização dos enterócitos (BEHRENS et al., 2002); (HENDERSON et al., 1999). O gene *Set1A* 309 pb produz uma toxina bacteriana de 116 KDa e expressa a enterotoxina chamada presente em muitas cepas de *Shigella flexineri*. Estas enterotoxinas agem como serina proteases e tem atividade de mucinase além de causarem a hemaglutinação de eritrócitos (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). (Figura 5).

Figura 5- Organização genética dos genes *pic/set1A* de EAEC cepa O42. O gene *pic* secreta a toxina serina protease e o gene *set1A* e *set1B* secreta a toxina ShET.



Fonte: Navarro-Garcia, 2011.

EAST-1 é codificada pelo gene *asta* de 110pb que aparece em 40% das amostras de EAEC e também em ETEC, EHEC, EPEC e DAEC (KAPER et al., 2004).

O gene *Asta* codifica a toxina termoestável agregativa e tem como função primordial agir na membrana do enterócito na ativação da enzima guanilato ciclase, resultando em secreção de íons e conseqüente diarreia aquosa (SAVARINO, 1993); (MENARD & DUBREUIL, 2002); (NATARO; KAPER, 1998).

1.2.4 INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO DA MUCOSA

A resposta inflamatória dos portadores de EAEC dependerá do seu sistema imune inato e do tipo de cepa de EAEC que foi adquirida. Aparecem nos exames em níveis aumentados na presença da doença as citocinas fecais e os marcadores inflamatórios como as interleucina (IL)-1 α , IL-1 β , IL-8, o interferon (INF) - γ , lactoferrina fecal elevada, leucócitos fecais e de sangue oculto (HUANG et al., 2006).

Dentre as quimiocinas pró-inflamatórias a liberação de IL-8 é o grande estímulo para a patogênese de EAEC atuando pelo recrutamento de neutrófilos na mucosa epitelial intestinal sem lesão da mesma, aumentando e facilitando a secreção intestinal (JIANG et al., 2003). Um estudo realizado no México em pacientes sintomáticos apresentou um alto nível de excreção fecal de IL-8 comparado aos viajantes que não desenvolveram a infecção por EAEC (JIANG et al., 2003). Determinou-se nas cepas de EAEC O42 que a IL-8 é reguladora da expressão dos genes de: IL-6, fator de necrose tumoral (TNF) - α , gene de crescimento (GRO) - α , GRO- γ , molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, (GRO) - α , GRO- γ , molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, fator estimulador de colônias de granulócitos macrófagos (GM-CSF) e IL- 1 α (HARRINGTON et al., 2006); (KHAN; STEINER, 2002). Todas essas ações são mediadas por uma proteína de superfície das EAEC chamada flagelina (fliC), responsável pela ligação às células epiteliais através dos receptores Toll-like 5 (TLR5), estes receptores sinalizam à proteína quinase P₃₈, a ativação do mitógeno ativador da proteína quinase e do fator nuclear Kappa B (NF- κ B), que induz à transcrição de citocinas pró-inflamatórias a partir de células epiteliais e de monócitos, entre elas a proteína MAPK, que apresentam várias funções como aquelas relacionadas com o stress celular e com a resposta inflamatória do hospedeiro às substâncias microbianas (KHAN; STEINER, 2002).

1.3 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

As hemolisinas são produzidas por muitas bactérias gram positivas e gram negativas e são toxinas que atuam sobre a membrana dos eritrócitos e de diversos tipos celulares. Este grupo de toxinas, ao contrário de outras, não são internalizadas

pelas células alvo, mas agem ativamente sobre as membranas celulares causando distúrbios em sua estrutura e função manifestadas sob a forma de lise e morte celular. As hemolisinas não atuam somente sobre os eritrócitos mas causam também dano a fibroblastos, plaquetas, monócitos, granulócitos e células endoteliais e do miocárdio. Tal grupo de toxinas é reconhecido como um importante fator de virulência envolvido na patogênese bacteriana (CASTILHONE, 2007).

Hemolisinas (HlyE) são toxinas citolíticas e hemolíticas que perturbam a membrana plasmática em células humanas, além desta ação patogênica a hemolisina liga-se ao tecido vascular e de componentes do sangue tais como fibronectina e plasma (MAGALHÃES et al., 2011).

Uma pesquisa desenvolvida por Esparis em 2006 observou a atividade hemolítica em amostras de EAEC a partir do crescimento das amostras a 37°C por 18-24h, em placas contendo agar de tripticaseína de soja (TSA) acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro (ESPARIS et al., 2006). A formação de halos de hemólise total ao redor das colônias bacterianas foi classificada como β -hemólise, enquanto a lise parcial das hemácias foi definida como α -hemólise, amostras não hemolíticas foram caracterizadas pela ausência de halo de hemólise e denominadas de γ -hemólise (ELIAS et al., 2002); (HARRINGTON, 2005).

A produção de α -hemolisina foi identificada em algumas amostras de EAEC O42 e foi associada à capacidade de causar lise de células de cultura (ELIAS et al., 2002); (HARRINGTON, 2006). A hemolisina é um fator de virulência em cepas de *E. coli*, principalmente presente naquelas que desenvolvem doença uropatogênica, disponibilizam ferro e favorecem a destruição de células epiteliais e fagocíticas. No estudo realizado por Elias et al., (2002), a atividade hemolítica foi detectada em todas as amostras, expressando os tipos α (65%) e β (35%). Os dois tipos hemolíticos foram detectados tanto em indivíduos atendidos na Fiocruz quanto em pacientes atendidos no Hospital Universitário da UFRJ com quadro de pielonefrite e infecção urinária assintomática (ESPARIS et al., 2006). Entre as amostras isoladas de casos de UTI, foi observado apenas o tipo α -hemolítico (ESPARIS, 2006 *apud* BRAUNER, 1990); (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004); (NAVEEN; MATHAI, 2005); (SIEGFRIED; PUZOVÁ; MOLOKACOVÁ; FILKA, 1994); (JOHNSON; MANGES; O'BRYAN; RILEY, 2002).

1.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência a antimicrobianos tem apresentado acentuado aumento no Brasil e no Mundo. Dentre os diversos tipos de resistência bacteriana, a produção de betalactamase de espectro estendido (ESBL) é uma das principais enzimas produzidas pelas bactérias Gram negativas. São enzimas de origem plasmidial com resistência a antibióticos betalactâmicos como as penicilinas e cefalosporinas de primeira, segunda e terceira gerações aplicadas em bactérias Gram negativas. Essas enzimas são inibidas por drogas antimicrobianas como o ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (MARTINS; PICOLI, 2011); (STURENBURG; MACK, 2003).

A pesquisa da prevalência da enzima β -lactamase de espectro estendido pertencente às famílias de genes do tipo *TEM* e *CTX-M* nos ambientes hospitalares tem influência direta nas manobras de tratamento com antimicrobianos é necessária visto os mesmos constituírem um importante fator de virulência em pacientes hospitalizados (PFALLER; SEGRETI, 2006). As cepas de EAEC que produzem ESBLs variam conforme o país ou região de abrangência da pesquisa (FREITAS, 2003).

As enzimas ESBL evoluíram por mutação genética em β -lactamases clássicas (*tem-1*, *tem-2* e *shv-1*), formando ESBL do tipo TEM e SHV principalmente. Posteriormente surgiu a variedade CTX-M e tem se tornado prevalente em muitas regiões (OLIVEIRA et al., 2009 *apud* PATERSON; BONOMO, 2005). Essa enzima é muito comum em bactérias Gram negativas especialmente da família *Enterobacteriaceae*. A enzima TEM-1 é uma penicilinase plasmídio-mediada com ação sobre as penicilinas. Acima de 90% da resistência das *E. coli* sobre as ampicilinas deve-se a esta enzima (WHOLLEIN, 2009). Acima de 150 variações do gene *tem* já foram descritas (WHOLLEIN, 2009). Muitas bactérias que não possuem ESBL do tipo TEM ou SHV apresentam a família CTX-M, sendo o gene com maior número de variedades enzimáticas. Após 1995 estas enzimas CTX-M têm apresentado grande dispersão mundial, aparecendo na América do Sul, Ásia, Europa Oriental e Leste Europeu (WHOLLEIN, 2009 *apud* BONNET, 2004).

1.5 DIARREIA EM RONDÔNIA

São poucos os estudos realizados em Rondônia sobre *E. coli* diarreiogênicas. Pesquisas realizadas por Orlandi (2001) com 130 crianças entre 0 a 5 anos de idade, identificaram que o rotavírus foi o enteropatógeno mais frequente associada com diarreia em (19,2%) das amostras, seguido de *Shigella flexneri* (6,15%) e *S. sonnei* (1,5%) e a *Salmonella sp.* (6,9%), quatro casos de infecções por *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) (3,1%), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) (2,3%) dos casos, um caso de infecção por *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (0,8%) e um caso de *Yersinia enterocolitica* (0,8%), foram também identificados. Infecções mistas foram observações frequentes, associando rotavírus, EPEC e *Salmonella sp.* com *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* (ORLANDI et al., 2001).

Outro estudo realizado pelo mesmo grupo entre os anos de 2000 a 2002, mostrou que entre 877 crianças, os rotavírus aparecem em 111 casos de diarreia e os adenovírus em 30 casos (30%), as *E. coli* diarreiogênicas são o segundo microorganismos observado com 88 casos (18,7%) (ORLANDI et al., 2006).

Dados coletados do Ministério da Saúde, Datasus são mostrados na tabela 1 a taxa de internação hospitalar por diarreia no município de Porto Velho comparado com municípios brasileiros com mais de 300 000 habitantes entre os anos de 2003 a 2008.

Tabela 1- Posição no ranking da taxa de Internação hospitalar de pacientes com diarreia.

UF	Município	2003	2004	2005	2006	2007	2008
RO	Porto Velho	27	19	17	19	18	29
AC	Rio Branco	15	20	13	10	12	24
PA	Belém	10	7	6	2	2	2
AL	Maceió	1	3	3	8	7	9
GO	Goiânia	12	13	12	13	19	12
SP	São Paulo	69	67	64	63	60	58
PR	Curitiba	49	68	55	45	43	42

Fonte: Adaptado de Kronenberg & Júnior, 2010.

A avaliação das doenças diarreicas tem sido realizada em vários estados do país e mais recentemente, com maior ênfase na identificação das enterobactérias patogênicas e genótipos de vírus circulantes. Entretanto, Rondônia, ainda não possui um acompanhamento com dados consolidados referentes à identificação dos agentes etiológicos envolvidos nas infecções locais, apenas alguns trabalhos pontuais foram divulgados. Além disso, torna-se relevante avaliar a epidemiologia local das *E. coli* diarreiogênicas na população infantil de Porto Velho-RO.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização fenotípica e molecular das amostras de *Escherichia coli* enteroagregativa isoladas de crianças com gastroenterite na região de Porto Velho – Rondônia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil dos genes de virulência das amostras isoladas de EAEC.
- Caracterizar os diferentes padrões de citoaderência dos isolados de EAEC;
- Analisar a capacidade de formação de biofilme nos isolados de EAEC;
- Caracterizar e determinar o padrão de resistência aos antibióticos de EAEC por meio de testes fenotípicos e moleculares;
- Identificar o padrão de atividade hemolítica dos isolados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA

O presente estudo foi realizado utilizando-se um total de 108 amostras de EAEC que estavam armazenados sob refrigeração (-80°C) no Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM). Todos os isolados de EAEC foram provenientes da coleta realizada em amostras fecais de crianças de 0 a 6 anos de idade, admitidas no Hospital Infantil Cosme e Damião (HICD) com quadro clínico de gastroenterite aguda, no período de fevereiro de 2010 a fevereiro de 2012. Um total de 1625 isolados de *Eschechia coli* foram identificados por testes bioquímicos e submetidos à técnica de PCR multiplex para detecção de genes de virulência que os caracterizavam como pertencentes a alguma categoria de *E.coli* diarreiogênica, sendo identificados 233 isolados (14,3%) de *E.coli* com genes de virulência, destes, 117 eram pertencentes às cepas de EPEC (50,2%), 108 (46,3%) EAEC, 5 (2,14%) ETEC e 2 (0,85%) EHEC (RODRIGUES, 2013).

3.2 LOCAL DO ESTUDO

As crianças com quadro clínico de gastroenterite aguda que participaram da pesquisa mediante autorização de seu responsável legal no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), constam no APÊNDICE I, conforme estabelecido na Resolução CNS 466/12.

O Hospital Infantil Cosme e Damião é o principal centro de atendimento médico infantil do Estado de Rondônia, sendo uma das Unidades de Saúde pertencente à Secretaria de Estado da Saúde (SESAU/RO).

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo utilizou amostras biológicas armazenadas, que foram coletadas para realização do projeto de pesquisa intitulado: “Caracterização etiológica e molecular de vírus associados à gastroenterite em crianças de 0 a 6 anos de idade na região de Porto Velho-RO”, com protocolo de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo seres humanos do Centro de Pesquisa

em Medicina Tropical (CEP/CEPEM), sob o número de protocolo 0113/2010, parecer nº 19/2010.

3.4 CARACTERIZAÇÕES FENOTÍPICAS

Todas as 108 amostras identificadas como EAEC que estavam armazenadas no laboratório de microbiologia do CEPEM foram semeadas em placa contendo Ágar MacConkey (MC) para isolamento das colônias de *E. coli*, em seguida foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por um período de 16 a 24 horas. Tal procedimento foi realizado para se verificar as características morfológicas e a

pureza das colônias. Nos casos de dúvida em relação à morfologia das colônias, foram realizados testes bioquímicos, tais como citrato, indol e Raj & krishna para identificação do agente bacteriano (BOPP; BRENNER; WELLS; STROCKBINE, 1999).

3.5 EXTRAÇÕES DE DNA CROMOSSÔMICO BACTERIANO

A partir desta caracterização fenotípica inicial, os isolados de EAEC foram submetidos à extração de DNA cromossômico e plasmidial segundo o método Fenol/Clorofórmio. Para realização de tal procedimento, o DNA cromossômico foi extraído partindo-se de culturas de 5 mL de caldo LB, sob agitação durante a noite. As células foram separadas por centrifugação a 5000rpm/10', e ressuspensas em 300µL de tampão TEM. Foram então adicionados: 30µL de lisozima (20mg/mL) e incubados por 30' a temperatura ambiente, em seguida adicionou-se 50µL de Triton X-100 a 10% e 20 µL de NaCl 3M, a suspensão foi aquecida a 60°C em banho-seco, por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 2µL de RNase (10mg/mL) seguida de nova incubação por 15 minutos a 37°C em banho-seco. Após esse período de tempo foram adicionados 25µL de SDS 10% e após homogeneização, foram adicionados 3 µL de proteinase-K (10mg/mL) e incubados a 37°C por 15', após este período, adicionou-se 500 µL de fenol, e a suspensão foi agitada por 5' (sem auxílio de Vortex). O material foi centrifugado a 2.000 rpm/10', a temperatura ambiente a fim de recuperar a fase aquosa. À fase aquosa foi adicionado 400 µL de clorofórmio, seguida de centrifugação e nova coleta da fase aquosa, onde se adicionou 400 µL de

clorofórmio, seguido de centrifugação e recuperação da fase aquosa. Em seguida adicionaram-se 25 µL de NaCl 3M e vagarosamente, 1mL de etanol 100% a -20°C. O DNA foi separado por centrifugação e lavado com etanol 70%, em seguida o DNA seco foi diluído em TE (Tampão EDTA) e estocado a -20°C (BERNIER; GOUNON; BOUGUÉNEC, 2002).

3.6 TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

As amostras foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), pelo método de difusão em disco de Kirby & Bauer, conforme recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), a fim de se detectar e estabelecer fenotipicamente o perfil de sensibilidade bacteriana *in vitro*, frente aos agentes antimicrobianos.

Antes da realização do teste de sensibilidade, placas contendo o ágar Muller-Hinton foram preparadas com uma espessura de aproximadamente 4 mm, o que corresponde a 25 mL do meio para placas de 90x15mm. As placas devem conter a espessura média de 4 mm não podendo ser inferior a 3 mm ou superior a 5 mm para não serem o motivo de resultados falsos.

Para realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos as amostras foram previamente cultivadas em 4 mL de caldo LB e levadas para estufa bacteriológica a uma temperatura de 37°C durante um período de 16 a 24 horas. No dia seguinte as amostras foram retiradas da estufa e cerca de 75 µL do caldo LB contendo a bactéria foram adicionados a uma solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%) até se obter uma turvação compatível com o grau 0,5 na escala Mac Farland. Posteriormente, um swab estéril foi embebido nesta suspensão bacteriana, sendo comprimido contra a parede do tubo para se retirar o excesso, e em seguida semeado em placa contendo ágar Muller-Hinton de forma a abranger toda a superfície da placa.

Após um período de 15 minutos, os discos impregnados com antibióticos nas concentrações expressas na tabela 1, foram colocados sobre a superfície do meio com o auxílio de uma pinça flambada e resfriada, exercendo-se uma leve pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão dos discos. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18-24 horas. Posteriormente, as placas foram retiradas da estufa e com o auxílio de uma régua, o

diâmetro dos halos inibitórios de cada disco de antibiótico foi medido e anotado para posterior consulta na tabela recomendada pelo CLSI, a fim de se determinar se a bactéria em análise é Sensível (S), Intermediário (I) ou Resistente (R) aos antibióticos testados (Tabela 2).

Tabela 2- Diâmetro do halo de inibição para cada classe de antibiótico testado

CLASSE	ANTIBIÓTICO	S	I	R
Cefens	Cefuroxima (30µg)	≥23	15-22	≤14
Cefens	Ceftazidima (30µg)	≥21	18-20	≤17
Carbapenêmicos	Imipenem (10µg)	≥23	20-22	≤19
Combinações β-lactâmico com inibidor de β-lactamase	Piperaciclina - Tazobactam (100/10µg)	≥21	18-20	≤17
Combinações β-lactâmico com inibidor de β-lactamase	Amoxicilina - Ácido clavulânico (20/10µg)	≥18	14-17	≤13
Inibidores de folato	Trimetoprim-sulfametoxazol	≥16	11-15	≤10
Aminoglicosídeos	Gentamicina (10µg)	≥15	13-14	≤12
Aminoglicosídeos	Amicacina (30µg)	≥17	15-16	≤14
Tetraciclinas	Tetraciclina (30µg)	≥15	12-14	≤11
Penicilinas	Ampicilina (10µg)	≥17	14-16	≤13
Fenicóis	Cloranfenicol (30µg)	≥21	16-20	≤15
Fluroquinolonas	Ciprofloxacina (5µg)	≥21	16-20	≤15

Fonte: Adaptado de acordo com as recomendações do CLSI (2012). Diâmetros medidos em milímetros.

Doze discos impregnados com antibióticos foram utilizados para realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos: Cefuroxima (CRX), Gentamicina (GEN), Imipenem (IPM), Piperaciclina+Tazobactam (PPT), Tetraciclina (TET), Trimetoprim - Sulfametoxazol (SUT), Amoxicilina + Ácido Clavulânico (AMC), Amicacina (AMI), Ampicilina (AMP), Cloranfenicol (CLO), Ciprofloxacina (CIP) e Ceftazidima (CAZ).

3.7 TESTES DE SENSIBILIDADE PARA DETECÇÃO DE ESBL

Para detecção fenotípica de ESBL (beta lactamase de espectro estendido), utilizou-se o método de disco de difusão em Agar (ou método de aproximação de disco) juntamente com o método de duplo disco (ou disco combinado), segundo o recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Para realização de tal procedimento foram utilizados os seguintes antibióticos: Amoxicilina + ácido clavulânico (AMC) de 30µg, Cefpodoxime (CPD) de 10µg, Cefotaxima (CTX) de 30µg, Aztreonam (ATM) de 30µg, Ceftriaxona (CRO) de 30µg e Ceftazidima (CAZ) de 30µg, a uma distância de 20 a 30 mm de centro a centro, em relação ao disco central (tabela 1). Como controle positivo utilizou-se uma cepa padrão de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 produtora de ESBL.

Para realização do teste utilizou-se um disco de amoxicilina + ácido clavulânico no centro de uma placa contendo ágar Muller Hinton (4 mm) previamente inoculada, pelo método de alagamento, com as cepas utilizadas no estudo, ajustadas a uma escala de 0,5 Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ ufc/mL), e ao redor deste disco central utilizou-se os demais antimicrobianos citados anteriormente, respeitada a distância de 20 a 30 mm.

Posteriormente as amostras foram incubadas em uma estufa bacteriológica por um período de 18 a 24 horas a 37°C. Após incubação, realizou-se a leitura do diâmetro dos halos e a verificação de formação ou não de uma zona fantasma “Ghost Zone” entre qualquer um dos antimicrobianos testados em relação ao disco central contendo ácido clavulânico. A formação de uma zona fantasma tem resultado positivo para ESBL e a presença de um halo menor que o apresentado na tabela 3 é indicativo da produção de beta-lactamases de espectro estendido (adaptado: CLSI, 2012).

Tabela 3- Diâmetro dos halos de inibição aos antibióticos β -lactâmicos para detecção de ESBL.

Agente antimicrobiano	Halo de difusão do disco (mm)*
Cefotaxima (CTX)	≤ 27 mm
Aztreonama (ATM)	≤ 27 mm
Cefpodoxima (CPD)	≤ 17 mm
Ceftriaxona (CRO)	≤ 25 mm
Ceftazidima (CAZ)	≤ 22 mm

Fonte: CLSI (2012).

3.8 DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA ATRAVÉS DA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A pesquisa dos genes de resistência e de virulência foi realizada através da reação de PCR. Para cada reação de amplificação foram empregados 1 μ l da enzima Taq polimerase; 01 mM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); tampão de amostra (10mM Tris HCl, pH 8.3; 50mM KCl); 10pMol de cada primer (tabela 3) 1,5 – 3,0 mM de $MgCl_2$ e 1 μ L da solução de DNA, diluídos em tampão adequado.

As condições empregadas na amplificação dos genes *ctx-m* e *tem* foram: 1 ciclo [94° C/ 2']; 35 ciclos [95°C 20'', 51°C 30'', 72°C 30'']; 1 ciclo [72°C 3']. Para a pesquisa dos genes *set1A*, *asta*, *afA1*, *aata*, *aggR*, *pet*, *irp2*, *shf* e *pic* utilizou-se as seguintes condições: 1 ciclo [94° C/ 30'']; 30 ciclos [94°C 30'', 57°C 45'', 72°C 1.30' ; 1 ciclo [72° C 7']. Foi utilizada como controle negativo a cepa *Klebsiella pneumoniae* CCBH 4955 para a procura dos genes *ctx-M* e *tem*, e uma cepa EAEC 042 como controle positivo dos genes de virulência (tabela 4).

Tabela 4- Sequência de primers que codificam genes de virulência usados nesse estudo.

Gene ^a	Função	Sequências dos primers	(bp)	Referência
aggR*	Ativador	5' - CTAATTGTACAATCGATGTA - 3'	308	Mohamed <i>et al</i> 2007
	Transcricional de AAF/I e AAF/II	5' - ATGAAGTAATTCTTGAAT - 3'		
aap*	Dispersina	5' - ATGAAAAAATTAAGTTTGTTATCTT - 3'	351	Mohamed <i>et al</i> 2007
		5' - TTATTTAACCCATTCGGTTAGAGC - 3'		
aatA*	Transportador	da5' - CTGGCGAAAGACTGTATCAT - 3'	630	Mohamed <i>et al</i> 2007
	dispersina	5' - CAATGTATAGAAATCCGCTGTT - 3'		
astA	Toxina termo estável	5' - ATGCCATAACACAGTATAT - 3'	110	Mohamed <i>et al</i> 2007
	EAST1	5' - GCGAGTGACGGCTTTGTAGT - 3'		
pet	Toxina	5' - ACTGGCGGACTCATTGCTGT - 3'	832	Mohamed <i>et al</i> 2007
		5' - GCGAGTGACGGCTTTGTAGT - 3'		
shf	ORF possivelmente envolvido na formação de biofilme	5' - ACTTTCTCCCGAGACATTC - 3'	613	Mohamed <i>et al</i> 2007
		5' - CTTTAGCGGGAGCATTAT - 3'		
irp2†	Biosíntese de yersineabactina	da5' - AAGGATTCGCTGTTACCGGAC - 3'	264	Mohamed <i>et al</i> 2007
		5' - TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT - 3'		
set1A†	Shigella enterotoxina 1	5' - TCACGCTACCATCAAAGA - 3'	309	Mohamed <i>et al</i> 2007
		5' - TATCCCCCTTTGGTGGTA - 3'		
blaCTX - M	ESBL do tipo CTX	5' -CGCTTTGCGATGTGCAG - 3'	550	Edelstein <i>et al.</i> , 2003
		5' -ACCGCGATATCGTTGGT - 3'		
blaTEM	ESBL do tipo TEM	5' -GAGTATTCAACATTTCCGTGTC - 3'	1080	Schmitt <i>et al.</i> , 2007.
		5' -TAATCAGTGAGGCACCTATCTC - 3'		

Fonte: Mohamed *et al.*, 2007 & Czczulin *et al.*, 1999.

Para visualização dos produtos de PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese (Minirum GE-100) em gel de agarose a 1%, contendo o tampão de corrida TBE (Tris Borato com EDTA) a uma concentração de 0,5 g/mL, e coradas com GelRed 10.000x com (diluição de 1:500). Posteriormente, as amostras foram visualizadas em luz ultravioleta (UV) com o auxílio do transiluminador e fotodocumentadas por este mesmo aparelho.

3.9 TESTES DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

As amostras de EAEC foram testadas quanto à capacidade de formação de biofilme. Para tal procedimento as amostras e o controle positivo (EAEC 042) foram previamente cultivados em 4 mL de caldo LB e incubados em estufa bacteriológica a 35°C durante o período de 18 a 24 horas.

Após esse período de incubação, as amostras foram retiradas da estufa e uma alíquota contendo cerca de 75µL do caldo LB contendo a cultura bacteriana foi retirada e diluída em solução salina (soro fisiológico) para obtenção de uma escala de turbidez equivalente a 0,5 MacFarland (Laborclin), a qual corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (Ufcs). Posteriormente, 1µL desta solução na escala de 0,5 MacFarland, foi retirado e colocado em 1,5 mL de caldo LB estéril, com a finalidade de obter uma concentração aproximada de 100.000 ufc/mL.

Em seguida, 200 µL desta solução foram distribuídas nos poços de uma microplaca de 96 poços (fundo reto), em triplicata para cada amostra, inclusive para o controle positivo (EAEC O42) e para o controle negativo (o qual foi utilizado o caldo LB sem a bactéria). Também foi feito o espelho da microplaca, a fim de se obter a informação correta quanto a localização das amostras. Posteriormente, a microplaca foi incubada em estufa bacteriológica a 35°C por um período de 18 a 24 horas.

Após o período de incubação, a microplaca foi retirada da estufa e o conteúdo de cada poço foi retirado e lavado 4 vezes com 200 µL de PBS (OBS: após cada lavagem, a microplaca foi levada ao agitador Kline por um período de 1 a 2 minutos). Posteriormente, a microplaca foi incubada em estufa bacteriológica a 60°C por 1 hora para secagem. Logo após esse período de incubação, a microplaca foi retirada da estufa e as amostras foram coradas com 200 µL de cristal violeta a 5% por um período de 1 minuto.

Em seguida, a microplaca foi lavada 4 vezes com 200 µL de água de torneira, e levada ao agitador Kline por um período de 1 a 2 minutos após cada lavagem. Na última lavagem todo conteúdo do orifício da microplaca foi retirado e 200 µL de SDS a 1% foi adicionado em cada poço por um período de 15 minutos. Após isso, foi realizada a leitura da microplaca em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 640 nm.

A intensidade da cor azul/violeta nos poços da microplaca indica aderência bacteriana. Baseando-se na intensidade da cor e nos valores obtidos no espectrofotômetro as amostras foram agrupadas em 3 categorias: Não-aderente (NA), quando o valor da densidade óptica (DO) foi menor ou igual a 0,120 nm, Fracamente-aderente (FCA), quando o valor da D.O foi entre 0,121 e 240 nm, ou Fortemente-aderente (FMA), quando o valor da D.O foi maior ou igual a 0,241 nm

(GORDON; ANDREW; JANARA; LARRY; FRED; DENNIS; EDWIN, 1985).

3.10 TESTES DE HEMÓLISE

O teste de hemólise foi realizado a fim de se verificar a capacidade de atividade hemolítica das cepas de EAEC. Tal procedimento foi realizado em uma placa contendo ágar sangue suplementado com 5% de sangue de carneiro e solução de CaCl_2 (Cloreto de Cálcio), a fim de se evidenciar a formação de um halo ao redor das colônias.

O preparo das placas de ágar sangue deu-se da seguinte forma: um volume de 70 mL de sangue de carneiro desfibrinado foi submetido à centrifugação a 1.500 rpm por 10 minutos, posteriormente iniciou-se a lavagem das hemácias em que o sobrenadante foi desprezado e as hemácias foram suspensas em uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) equivalente ao volume inicial de sangue. Após duas lavagens adicionais as hemácias foram suspensas em PBS e acrescidas ao meio base resfriado a 45-50°C esterilizado por autoclavação na concentração final de 5%, e solução de CaCl_2 na concentração final de 10 mM.

Para semeio das bactérias em ágar sangue as amostras foram previamente cultivadas em 4 mL de caldo LB a 37°C por um período de 18-24 horas, para isso utilizou-se colônias isoladas em ágar MacConkey a fim de se verificar se as amostras estavam puras. Após incubação, as amostras que estavam em caldo LB foram semeadas em placas de ágar sangue (dividas em 3 partes) com o auxílio de uma alça de platina estéril e resfriada. Em seguida as amostras foram incubadas a 37°C durante 18-24 horas, após esse período as placas foram examinadas quanto à presença de um halo de hemólise ao redor das colônias em 3 e 24 horas de incubação.

A presença de um halo de coloração transparente em torno do crescimento bacteriano indica lise total dos eritrócitos sendo denominado de Beta-hemólise. A presença de halo esverdeado ao redor das colônias semeadas (lise parcial dos eritrócitos) indica Alfa-hemólise, enquanto que a ausência de halo ao redor das colônias (eritrócitos permanecem íntegros, sem hemólise) é Gama-hemólise (HAQUE et al., 1994).

3.11 ENSAIOS DE ADESÃO EM CÉLULAS

3.11.1 CULTIVO DE CÉLULAS DE CARCINOMA DE LARINGE, HEp-2

Para realização dos ensaios de citoaderência, células HEp-2 foram cultivadas em garrafas de plástico de 25 cm² para cultura celular, contendo 3 ml de meio mínimo essencial e Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e gentamicina (1:1000). Em seguida, os frascos de cultura celular foram incubados em estufa de CO₂ (SANYO CO₂ Incubator), a uma temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por cerca de três a quatro dias. Após esse período, as células cultivadas foram utilizadas nos ensaios de adesão (CRAVIOTO, 1991).

3.11.2 PREPARO DAS PLACAS PARA O ENSAIO DE CITOADERÊNCIA

Para realização do ensaio de citoaderência, placas de cultura de células de fundo chato contendo 24 poços foram preparadas adicionando-se lamínulas circulares de vidro (espessura 0,13 - 0,16mm – Vidrobras) em cada poço. Em seguida, os frascos de plásticos contendo as células Hep-2 foram retirados da estufa de CO₂ e o meio de cultivo foi removido. Logo após, a monocamada celular foi lavada com 1 mL de meio incompleto (DMEM) e em seguida removido. Posteriormente, foram adicionados 500µL de tripsina EDTA para o desprendimento celular e logo após foi realizada a incubação em estufa de CO₂ por um período de 5 a 10 minutos.

Após esse período de incubação, as células foram retiradas da garrafa e colocadas em um tubo tipo Falcon (15 mL) juntamente com 5 mL de meio incompleto para posterior centrifugação a uma rotação de 1.000 a 2.000 rpm por um período de 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e 5 mL de meio completo (DMEM + SFB 10%) foram adicionados ao *pellet* e homogeneizado com o auxílio de um vortex. Após essa etapa, cerca de 10µL desta suspensão foram retirados e colocados em câmara de Neubauer para contagem das células em microscópio óptico, tal procedimento foi necessário para se obter uma suspensão contendo 10⁵ (100.000) células por mL.

Em seguida, alíquotas de 1 mL dessa ressuspensão celular foram distribuídas nos poços contendo as lamínulas e as placas foram incubados em estufa de CO₂ a 37° C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas (CRAVIOTO, 1991).

3.11.3 PREPARO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS

Após 24 horas de incubação das células, as amostras de EAEC foram semeadas em 4 ml de Caldo LB e incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por um período de 18 a 24 horas, para sua posterior utilização no teste de adesão em célula.

Como controle positivo do teste de adesão, uma cepa padrão de EAEC típica (*aggR* O42) e para controle negativo foi reservado uma lamínula de células HEp-2 sem bactérias e utilizada uma bactéria não aderente DH10B (CRAVIOTO, 1991).

3.11.4 REALIZAÇÃO DO TESTE DE ADESÃO EM CÉLULAS HEp-2

Para a realização do teste de adesão as células Hep-2 que estavam incubadas em estufa de CO₂ a 37°C durante um período de 48 horas em placa de 24 poços foram inicialmente retiradas da estufa. Em seguida o meio de cultivo DMEM acrescido de 10% SFB foi retirado dos orifícios da placa e três lavagens com PBS foram realizadas.

Posteriormente 1 mL de DMEM acrescido de 2% de SFB e 2% de d-manose foram adicionados em cada poço. Após essa etapa, 40µL de caldo LB contendo as bactérias de interesse no estudo foram acrescidas nos orifícios e posteriormente placas de 24 poços foram incubadas juntas, sendo uma para o ensaio de 3 horas e outra para o ensaio de 6 horas.

Após a incubação de 3 e 6 horas, o meio de cultivo foi removido e a monocamada celular foi lavada por cinco vezes com PBS, a fim de se retirar as bactérias que não aderiram às células em cultivo. Em seguida as células foram fixadas com uma solução fixadora contendo ácido pícrico a 1,22%, formaldeído 40% e ácido acético glacial por um período de 10 minutos.

Posteriormente, as células foram coradas com soluções Instant Prov II e III do Kit de coloração Panótico Rápido (Instant Prov NewProv) por um minuto. Decorrido esse tempo, as preparações foram lavadas com água de torneira (de três a cinco vezes para a retirada do excesso de corante) e as lamínulas foram retiradas dos orifícios das placas e deixadas à temperatura ambiente para secagem. Após isso as lamínulas foram coladas em lâminas de ponta fosca com um esmalte incolor e visualizadas ao microscópio óptico com os aumentos de 400 e 1000 vezes.

Para interpretação dos resultados observados nas lâminas foram considerados os seguintes padrões de adesão: Adesão localizada (AL), caracterizada pela formação de microcolônias de bactérias aderidas a sítios localizados da célula; Adesão difusa (AD) com bactérias aderidas ao acaso por toda a superfície celular; Adesão agregativa (AA) quando as bactérias se aderem sobre a célula e nos espaços intercelulares, lembrando a disposição de *stacked bricks*; Adesão localizada like (ALL) quando as bactérias formam apenas microcolônias bacterianas soltas que são detectados apenas depois de ensaios de adesão prolongadas ou seja, após 6 horas de incubação formando o padrão de aderência LA-like (LAL). (CRAVIOTO, 1991).

3.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As hipóteses que testamos foram as hipóteses de *nulidade*. Em nossas pesquisas. O χ^2 foi aplicado como teste de concordância e a H_0 testada sempre é a concordância entre as frequências observadas e as frequências esperadas, onde $H_0: f_o=f_e$, um χ^2 baixo confirma a hipótese H_0 , mas um valor elevado rejeitará a H_0 . Procuramos estabelecer se o valor obtido é significativo ou não, utilizamos uma tabela de distribuição do χ^2 com várias linhas e diversos graus de liberdade (CENTENO, 1999).

As análises estatísticas aplicadas no presente estudo foram realizadas utilizando testes não paramétricos, através do programa Excell 2010 com o Teste de Qui-Quadrado, χ^2 e a tabela de contingência 2x2. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$ (5%) e o Intervalo de confiança (IC) de 95% com 1 grau de liberdade (1GL). Para utilizarmos o teste de χ^2 construímos tabelas para os valores teóricos de χ^2 (anexo).

Testes foram realizados para se determinar a associação entre a resistência ao antibiótico ampicilina e a presença do gene *bla_{TEM}*, sendo esta afirmação a hipótese inicial (H_0). O valor de p foi considerado estatisticamente significativo quando $\chi^2 = 0,004579921$. Conclusão, o valor de χ^2 calculado não ultrapassou o tabelado, logo não há diferença significativa ao nível de 5%, aceita-se a hipótese nula (H_0).

Procuramos associar a aderência celular com a presença do gene de virulência *aggR* e comparamos o valor obtido com o valor esperado e verificamos que o obtido é menor, $\chi^2 = 1,843 < \chi^2 . 0,05$ com 1GL = 3,84, então não podemos rejeitar a hipótese de que a associação entre aderência celular é estimulada pela presença do gene *aggR*, que nos faz aceitar a hipótese formulada.

Testes realizados associando a resistência bacteriana ao antimicrobiano ampicilina é incrementada pela presença do gene de resistência *bla_{TEM}* (H_0), onde calculando o χ^2 o valor de $p = 0,078015975 < \chi^2 . 0,05$. (1GL) = 3,84. Concluímos que devemos aceitar a hipótese, os dados estão de acordo com a teoria.

Calculamos o χ^2 considerando que a formação de biofilme é incentivada pela presença do gene de virulência *irp2* (H_0), aceitamos que $\chi^2 = 0,268878 < \chi^2 . 0,05$. (1GL) = 3,84. Conclusão: aceitamos H_0 .

Associamos a resistência bacteriana a presença do antimicrobiano ampicilina e a presença do gene de resistência *bla-ctx-m* (H_0). Concluímos com a aceitação da hipótese, pois nos testes há concordância entre as variáveis, $X^2 = 0,723868049 < X^2_{0,05} (1GL) = 3,84$.

Relacionamos também a presença da enzima Esbl e o gene de virulência *bla-ctx-m* (H_0) e obtivemos um valor de p que nos diz que a probabilidade de um fator não potencializar a ação do outro é de exatamente $X^2 = 0,781524058 < X^2_{0,05} (1GL) = 3,84$. Concluímos com a aceitação de H_0 .

Foram obtidos dados que relacionam a resistência ao antibiótico ampicilina (AMP) e a presença de hemólise (H_0). Os resultados foram $X^2 = 0,851696713 < X^2_{0,05} (1GL) = 3,84$. Conclusão: aceita-se a hipótese.

4.0 RESULTADOS

4.1 PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Discos impregnados com antibióticos foram utilizados para realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos: Cefuroxima (CRX), Gentamicina (GEN), Imipenem (IPM), Piperaciclina+tazobactam (PPT), Tetraciclina (TET), Trimetoprim - Sulfametoxazol (SUT), Amoxicilina + Ácido Clavulânico (AMC), Amicacina (AMI), Ampicilina (AMP), Cloranfenicol (CLO), Ciprofloxacina (CIP) e Ceftazidima (CAZ). Quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, 12 antibióticos foram testados, dentre os quais a ampicilina (AMP), trimetoprim-sulfametoxazol (SUT) e tetraciclina (TET) foram os antibióticos que apresentaram uma maior frequência de resistência em que 70/108 (64,8%) isolados apresentaram resistência a ampicilina, 59/108 (54,60%) ao trimetoprim-sulfametoxazol e 49/108 (45,37%) a tetraciclina.

Em relação a sensibilidade os antibióticos amicacina (AMI), imipenem (IPM), ceftazidima (CAZ), piperaciclina+tazobactam (PPT) e gentamicina (GEN) foram os que apresentaram um maior número de isolados sensíveis com frequência de 106/108 (98,14%) para amicacina, 102/108 (94,4%) para imipenem, 99/108 (91,6%) para ceftazidima, 95/108 (87,9%) piperaciclina+tazobactam e 93/108 (86,0%) para gentamicina (Tabela 5).

Ainda na tabela 5, podemos observar os isolados que apresentaram o resultado de intermediário (11 a 22 mm). De modo geral a frequência de isolados que apresentaram perfil antimicrobiano intermediário foi baixa, entretanto para o antibiótico ciprofloxacina (PIC) apresentou uma frequência elevada com 49/108 dos isolados (45,37%).

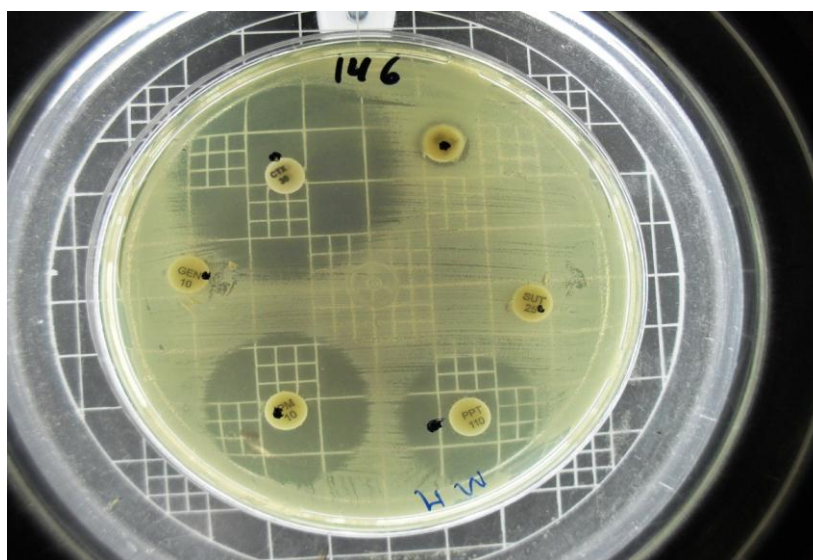
Tabela 5- Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de EAEC

ANTIBIOTICOS	RESULTADOS					
	Sensível	%	Intermediário	%	Resistente	%
Amoxicilina+Ác.						
Clavulânico (AMC)	78/108	72,2	25/108	23,1	5/108	4,63
Amicacina						
(AMI)	106/108	98,0	1/108	0,92	1/108	0,92
Ampicilina						
(AMP)	33/108	30,5	5/108	4,63	70/108	64,80
Ciprofloxacina						
(PIC)	50/108	46,3	49/108	45,3	9/108	8,33
Ceftazidima						
(CAZ)	99/108	91,6	6/108	5,55	3/108	2,77
Cloranfenicol						
(CLO/CTX)	85/108	78,7	2/108	1,85	21/108	19,40
Cefuroxina						
(CRX)	86/108	79,6	19/108	17,6	3/108	2,77
Gentamicina						
(GEN)	93/108	86,1	1/108	0,92	14/108	13,0
Imipenem						
(IPM)	102/108	94,4	5/108	4,63	1/108	0,92
Piperaciclina						
+Tazobactam (PPT)	95/108	87,9	11/108	10,2	2/108	1,85
Tetraciclina						
(TET)	58/108	53,7	1/108	0,92	49/108	45,30
Sulfametoxazol						
(STX)	48/108	44,4	1/108	0,92	59/108	54,60

Quanto aos isolados de EAEC resistentes, observou-se uma alta frequência de resistência para ampicilina 70/108 (64,8%), trimetoprim-sulfametoxazol 53/108 (54,63%) e tetraciclina 49/108 (45,37%), sendo que a maioria destes isolados apresentou resistência a três ou mais antibióticos. Podemos observar na tabela 6 e figura 6, o perfil antimicrobiano do isolado 146 de EAEC.

Tabela 6- Resultados da resistência e sensibilidade aos antimicrobianos.

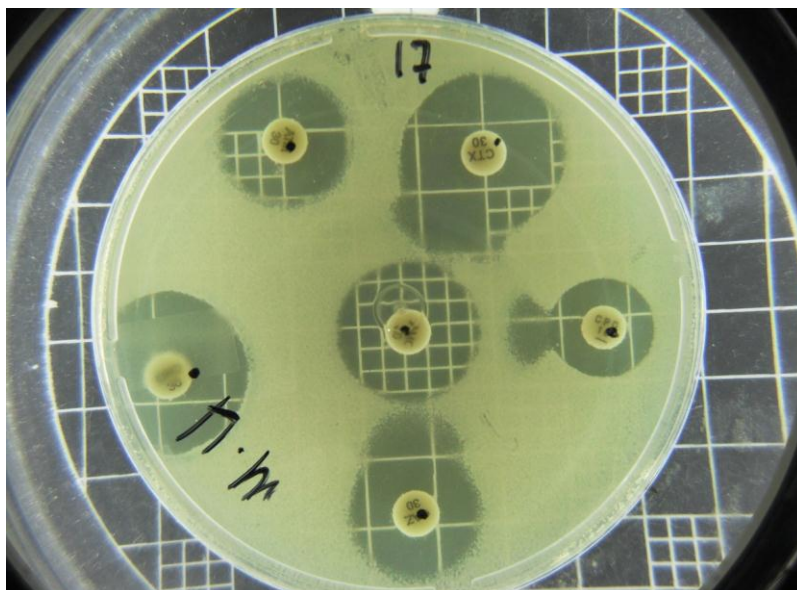
RESISTÊNCIA	SENSIBILIDADE
64,80% ampicilina	98,14% amicacina
54,60% sulfametoxazol	94,40% imipenem
45,37% tetraciclina	91,60% ceftazidima

Figura 6- Teste fenotípico de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) em ágar Muller-Hinton de um dos isolados de EAEC.

4.2 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE BETALACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL)

Em relação aos testes fenotípicos para detecção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), observamos que 18/108 (16,6%) dos isolados de EAEC apresentaram perfil da produção da enzima betalactamase. Na figura 7, é apresentado resultado confirmatório para a presença da enzima β -lactamase em um isolado de EAEC na placa nº 17. Na mesma figura, observamos o perfil de uma cepa padrão de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

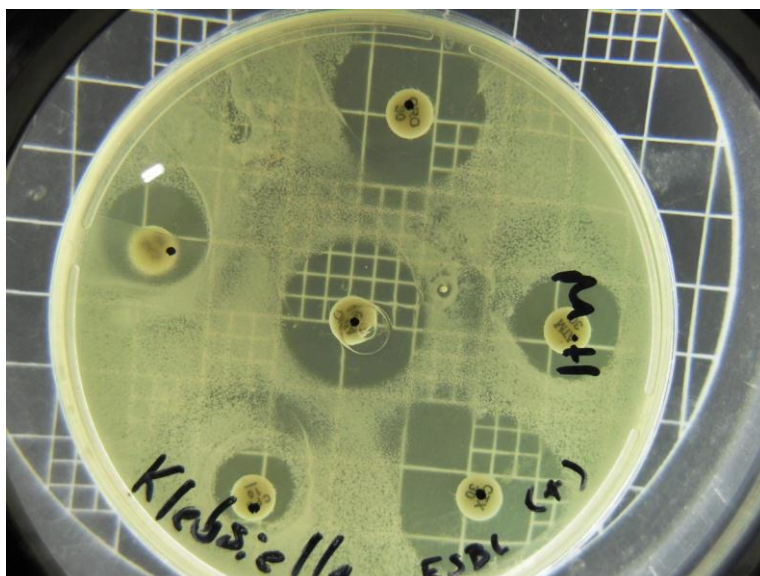
Figura 7- Teste de betalactamase de espectro estendido (ESBL).



Ainda na figura 7, observa-se o isolado de EAEC com a diminuição do halo de inibição entre os antibióticos testados e o disco central é indicativo da produção de beta-lactamase de espectro estendido.

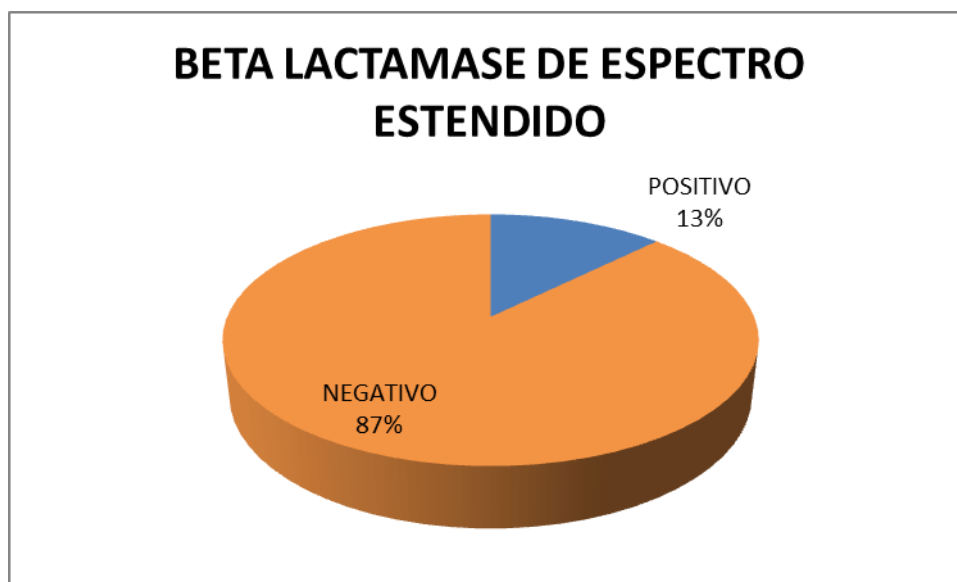
Na figura 8 observamos a formação de zonas fantasmas (“Ghost Zone”) entre os antibióticos testados (ctx, atm, cro, caz, cpd e o antibiótico central contendo amoxicilina+ácido clavulânico em uma cepa padrão de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 produtora da enzima.

Figura 8: Teste confirmatório para a produção da enzima β -lactamase com controle positivo.



Os resultados obtidos no teste fenotípico para a detecção da enzima betalactamase de espectro estendido, bem como suas associações, são mostradas na figura 9 abaixo.

Figura 9- Resultado do teste fenotípico para detecção de *bla*-ESBL de resistência.

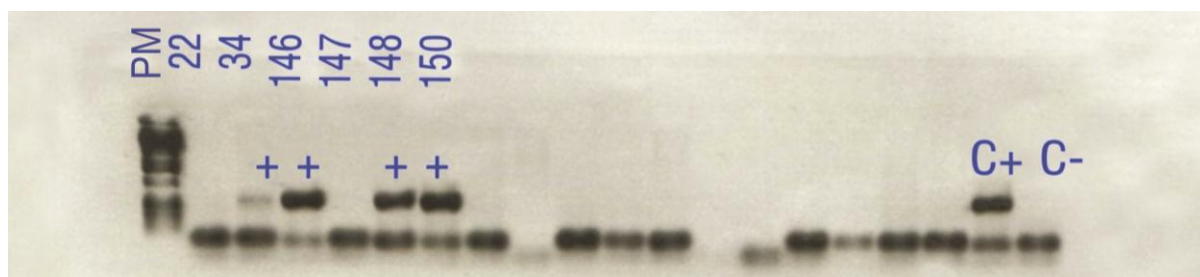


4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE GENES DE RESISTÊNCIA COM PRODUÇÃO DA ENZIMA β - LACTAMASE DE ESPECTRO EXTENDIDO

A pesquisa de genes codificadores de ESBL foi realizada através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) para os genes *bla*_{tem} e *bla*_{ctx-m}.

A presença do gene *bla*_{tem} foi detectado em 26/108 (24,07%) das amostras e 83/108 (76,85%) não apresentaram a presença do gene *bla*_{tem}. Quanto ao gene *bla*_{ctx-m} a frequência de positividade foi de 13/108 (12,03%) e 96/108 (88,8%) apresentaram resultados negativos. Na figura 10, é apresentada a foto de um gel de agarose a 1% com o produto de PCR amplificando para o gene *bla*_{ctx-m} de um gel de agarose (fig. 10).

Figura 10- Amplificação dos fragmentos codificadores de ESBL do tipo *bla*_{ctx} (fragmento de 550 pb) em isolados de EAEC e controle (-) a cepa *Klebsiella pneumoniae* CCBH 4955.



Na tabela 7 apresentamos os resultados coletados com os experimentos utilizando-se genes de resistência *bla*_{tem} e *bla*_{ctx-m}, bem como a correlação de ambos os genes de resistência.

Tabela 7- Apresentação da presença dos genes de ESBL do tipo *bla*_{tem} e *bla*_{ctx-m}.

Gene	Resistência	Presente	%	Ausente	%
	<i>bla</i> _{tem}	26/108	24,07	82/108	75,92
	<i>bla</i> _{ctx-m}	13/108	12,03	95/108	87,96
	<i>bla</i> _{tem} + <i>bla</i> _{ctx-m}	6/108	5,55	102/108	94,44

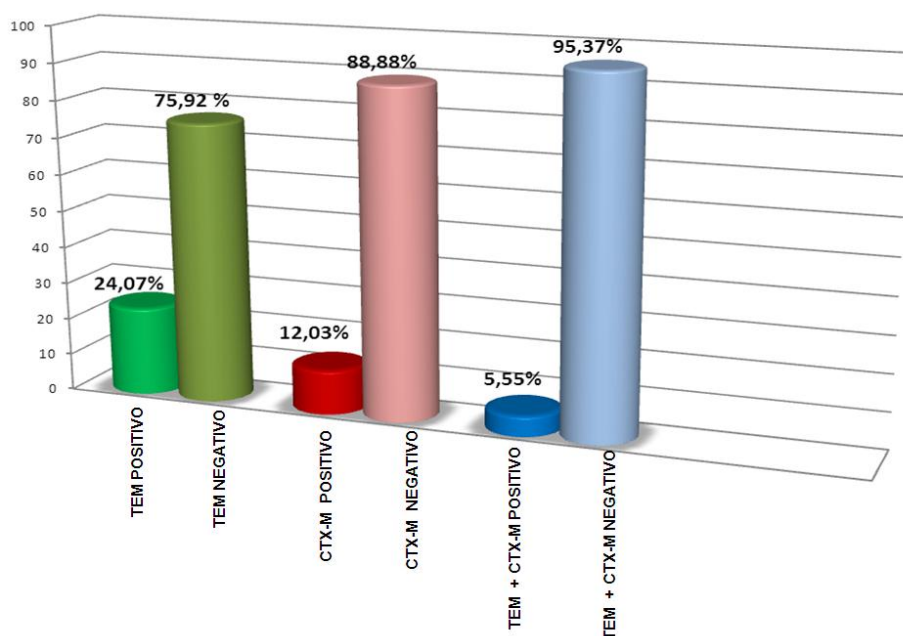
4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE FENÓTIPO ESBL E GENES ESBL DO TIPO *bla_{tem}* e *bla_{ctx-m}*

Procurou-se associar a presença de ESBL com dois genes de resistência: os genes *bla_{tem}* e os genes *bla_{ctx-m}*. A presença simultânea do gene que transcreve para o fenótipo ESBL-gene *bla_{tem}*, esteve presente em 6/108 (5,55%) das amostras e o fenótipo ESBL-gene *bla_{ctx-m}* em 2/108 (1,85 %) das cepas (tabela 8 e figura 11).

Tabela 8- Associação entre o fenótipo de ESBL versus genes de ESBL do tipo TEM e CTX.

Fenótipo ESBL x Genes <i>bla_{TEM}</i> e <i>bla_{CTX}</i>	Fenótipo ESBL x Gene <i>bla_{TEM}</i>	%	Fenótipo ESBL x Gene <i>bla_{CTX}</i>	%
	6/108	5,55	2/108	1,85

Figura 11- Associação de fenótipo ESBL e genes de resistência.



4.5 PESQUISA MOLECULAR DE GENES DE VIRULÊNCIA EM EAEC

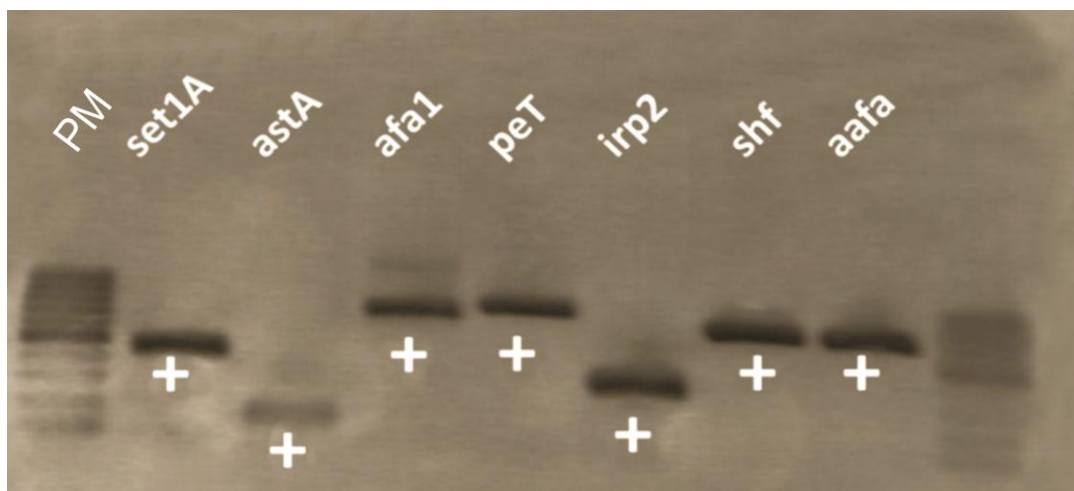
Em nossa pesquisa dos genes de virulência presentes em cepas de EAEC, utilizamos a técnica do pcr multiplex para detectar a presença dos genes: *irp2*, *astA*, *aggR*, *aataA*, *set1A*, *afa1*, *shf*, *pic* e *pet*. Observou-se que o gene *irp2* apresentava-se em 77/108 (71,30%) dos isolados destas amostras, seguido pelo gene de virulência *asta* presente em 68/108 (62,96%) das cepas, *aggr* 52/108 (48,15%), *aata* em 42/108 (38,90%) dos isolados, *set1A* em 41/108 (37,96%) dos isolados, o gene *afa1* 39/108 (36,11%), gene *shf* 37/108 (34,26%), o gene *pic* presente em 19/108 (17,60%) e *pet* 8/108 (7,40%) dos isolados pesquisados (tabela 9).

Tabela 9- Pesquisa dos genes de virulência em amostras de *E.coli* diarreio gênicas.

Gene Virulência	Presente	%	Ausente	%
<i>set 1A</i>	41/108	37,96	68/108	62,96
<i>astA</i>	68/108	62,96	41/108	37,96
<i>Afa1</i>	39/108	36,11	70/108	64,80
<i>aataA</i>	42/108	38,90	67/108	62,00
<i>aggR</i>	52/108	48,15	57/108	52,77
<i>pet</i>	8/108	7,40	101/108	93,50
<i>irp2</i>	77/108	71,30	32/108	29,60
<i>shf</i>	37/108	34,26	72/108	66,66
<i>pic</i>	19/108	17,60	90/108	83,35

Na figura 12 apresentamos o resultado em um gel de agarose contendo os sete genes de virulência detectados nas amostras diarreio gênicas.

Figura 12- Gel de agarose com pm de 1kb, mostrando os sete genes de virulência pesquisados em *E.coli* enteroagregativa.



Os fragementos acima apresentaram os seguintes tamanhos: *set-1A* (309pb), *astA* (110pb), *afa1*(750pb), *pet* (832pb), *irp2*(264pb), *shf* (613pb), *aataA* (630).

4.6 ASSOCIAÇÕES DOS GENES DE VIRULÊNCIA EM EAEC

Os principais fatores de virulência foram relacionados entre si. Os resultados são sumarizados na tabela 10.

Tabela 10- Correlação dos genes de virulência em EAEC.

Associação dos fatores de virulência de EAEC em pacientes com diarreia		
Genes	Nº	%
<i>aggR, aataA</i>	36/108	33,33
<i>aggR, aataA, astA</i>	24/108	22,22
<i>aggR, aataA, afa 1</i>	14/108	12,96
<i>aggR, aataA, shf</i>	17/108	15,74
<i>aggR, aataA, afa1, astA</i>	5/108	4,63
<i>aggR, aataA, afa1, set1A</i>	5/108	4,63
<i>aggR, astA</i>	37/108	34,26
<i>aggR, pet</i>	7/108	6,48
<i>aggR, set 1A</i>	19/108	17,60
<i>aggR, pic</i>	15/108	13,88
<i>aggR, irp2</i>	45/108	41,66

Individualmente, o gene de virulência *asta*, que traduz para a toxina semelhante a *Shigella*, esteve presente em 68/108 das amostras, seguido pelo gene *aggR*, gene mestre para a transcrição das fímbrias de aderência agregativa tipo I e

II, que foi observado em 52/108 dos isolados. De forma combinada os genes que apresentaram maior correlação na pesquisa foram *aggR-irp2* com 45/108, *aggR-astA* com 37/108 e *aggR-aatA* que foram observamos em 36/108 dos isolados.

4.7 DETECÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

Quanto à capacidade de formação de biofilme dos isolados de EAEC, 47/108 (43,52%) apresentaram um fenótipo fortemente aderente (FA), 21/108 (19,44%) fracamente aderente (FRA) e 39/108 (36,11%) não aderente (NA). Figura 13 e 14).

Figura 13- Teste de formação de biofilme dos isolados de EAEC.

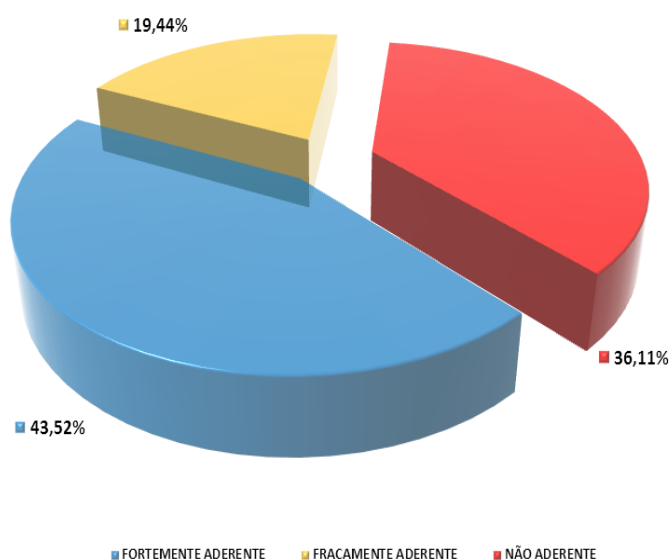
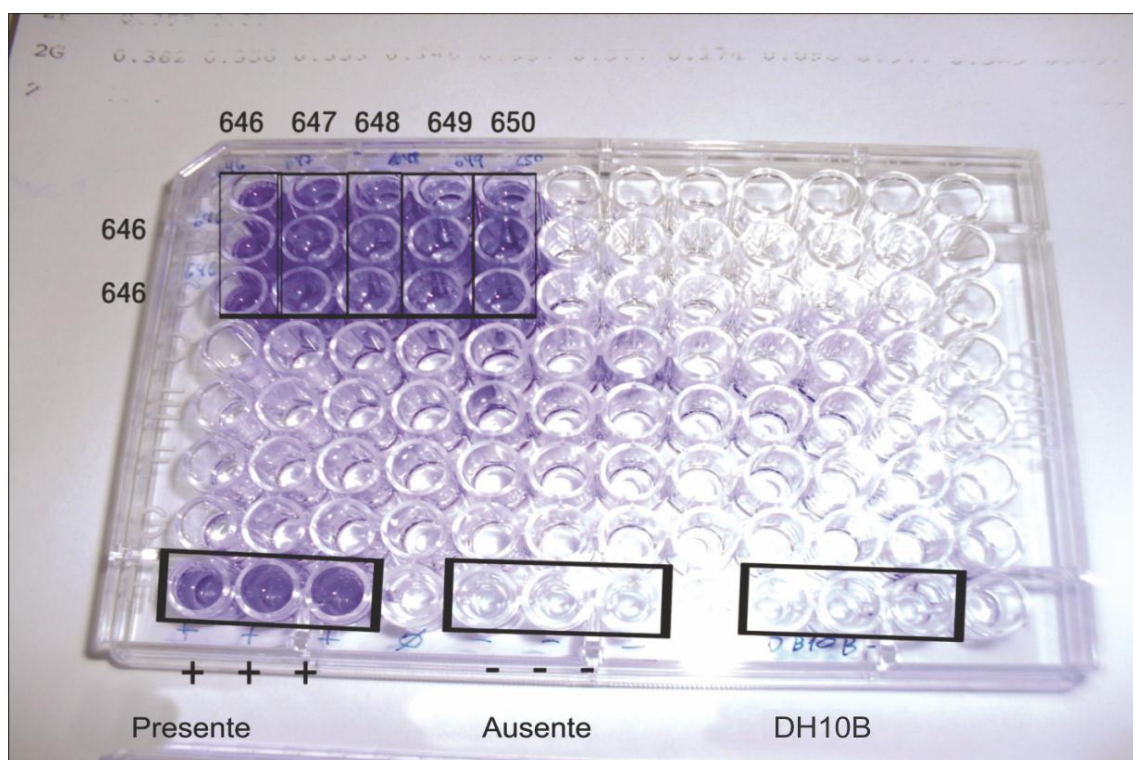


Figura 14- Teste de formação de biofilme por espectrofotometria nos isolados de *Escherichia coli* enteroagregativa.



Para cada isolado é realizado o teste em triplicata. Uma cepa de EAEC O42 foi utilizada como controle positivo. Para o controle negativo utilizou-se o caldo LB sem a bactéria, seguindo-se os mesmos procedimentos das demais amostras. Nesta imagem observa-se a presença de 5 amostras fortemente aderentes-FA (646, 647, 648, 649 e 650). As amostras que apresentam uma coloração transparente ou um roxo quase transparente são não aderentes.

4.8 ASSOCIAÇÃO ENTRE BIOFILME E A PRESENÇA DE GENES DE VIRULÊNCIA

Observou-se que no fenótipo fortemente-aderente (FA), a relação Biofilme+gene-virulência apareceu em maior proporção a relação entre Biofilme-*astA* em 31/108 (28,70%) das amostras, seguido pela relação Biofilme-*aggR* em 31/108 (28,70%) das cepas e Biofilme-*aata* em 27/108 (25,0%) dos achados. A menor relação Biofilme+gene-virulência aparece na relação entre Biofilme-*pic* em 10/108 (9,26%) dos achados e Biofilme-*pet* com 8/108 (7,40%) das amostras observadas (tabela 11).

Tabela 11- Associação entre formação de biofilme e presença de genes de virulência em isolados de *Escherichia coli* enteroagregativa.

Ocorrência de Formação de Biofilme (+) e presença de genes de virulência								
Gene	Fortemente	%	Fracamente	%	Não aderente	%	Fortes+Fracos biofilmes	%
<i>aggR</i>	31/108	28,70	10/108	9,26	11/108	10,18	41/108	37,96
<i>set1A</i>	18/108	16,66	10/108	9,26	10/108	9,26	28/108	25,92
<i>aatA</i>	27/108	25,00	10/108	9,26	5/108	4,63	37/108	34,26
<i>irp2</i>	36/108	33,33	15/108	13,88	25/108	23,15	51/108	47,22
<i>Pet</i>	8/108	7,40	-	-	-	-	-	-
<i>shf</i>	16/108	14,81	7/108	6,48	14/108	12,96	23/108	21,30
<i>astA</i>	31/108	28,70	20/108	18,52	20/108	18,52	48/108	44,44
<i>afa 1</i>	18/108	16,66	6/108	5,55	14/108	12,96	24/108	22,22
<i>pic</i>	10/108	9,26	6/108	5,55	3/108	2,77	16/108	14,81

4.9 TESTE DE ADERÊNCIA CELULAR

O teste de aderência celular utilizou células Hep-2 para verificação da capacidade de adesão das *E.coli* enteroagregativas a estas células. Observamos que 52/108 (48,15%) das amostras apresentaram aderência agregativa, 22/108 (20,37%) apresentaram aderência difusa, 7/108 (6,48%) apresentaram aderência localizada, 23/108 (21,29%) apresentaram padrão indeterminado e 5/108 (4,63%) não apresentaram aderência (figura 15,16,17).

Figura 15- Teste de aderência agregativa, controle (+)

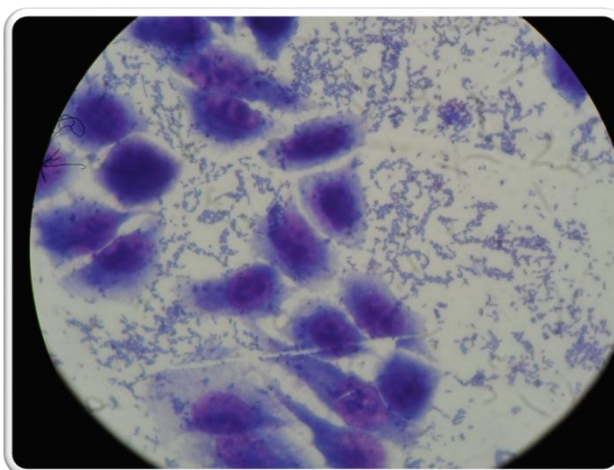
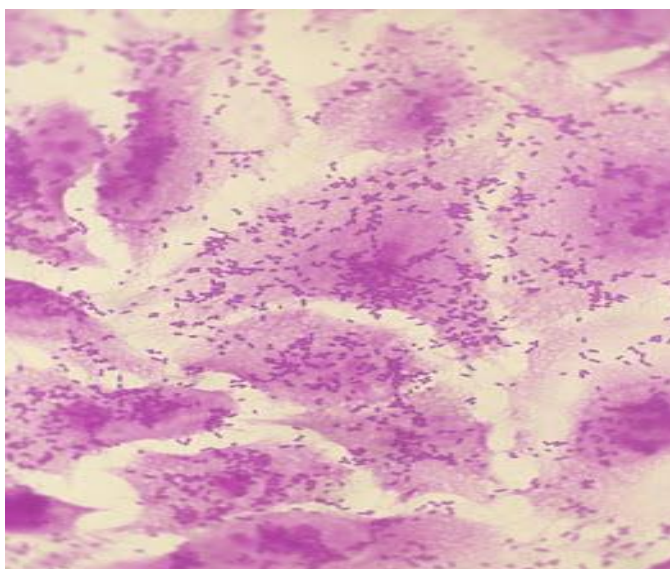
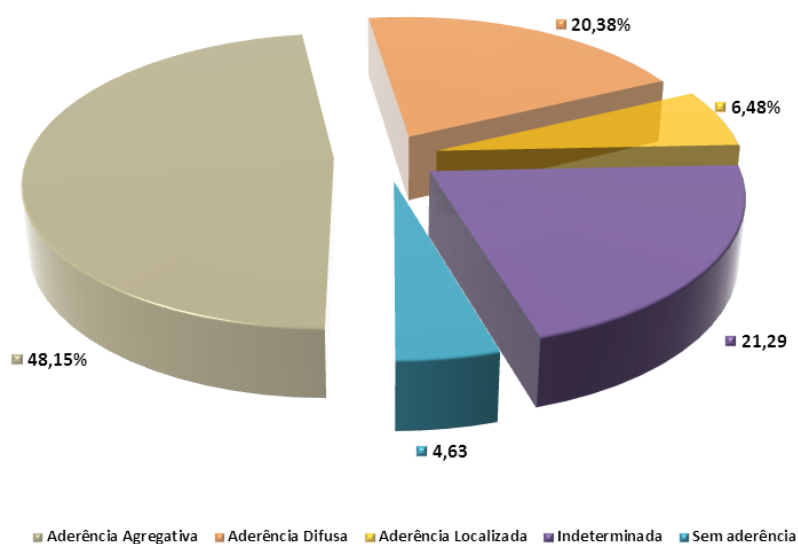


Figura- 16 Aderencia difusa, controle (-)



Adaptado de Neto, 2010.

Figura 117- Resultado do fenótipo de aderência agregativa, difusa, localizada, indeterminada e sem aderência.



4.10 ASSOCIAÇÃO ENTRE ADERÊNCIA CELULAR E FATORES DE VIRULÊNCIA

Relacionamos o fator de virulência de aderência celular com os genes de virulência identificados nos isolados de EAEC. Detectou-se que a relação entre

aderência-gene *asta* foi a mais freqüente entre os isolados de EAEC presente em 41,66% (45/108), seguido pela relação aderência-gene *aggR* presente em 40,74% (44/108) dos isolados (tabela 12).

Tabela 12- Associação entre aderência celular e fatores de virulência.

Adesão x <i>aafA</i>	Adesão x <i>astA</i>	Adesão x <i>shf</i>	Adesão x <i>afa 1</i>	Adesão x <i>aggR</i>
25/108 (23,15%)	29/108 (26,85%)	16/108 (14,8%)	11/108 (10,18%)	30/108 (27,7%)

4.11 TESTE DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS ISOLADOS DE EAEC

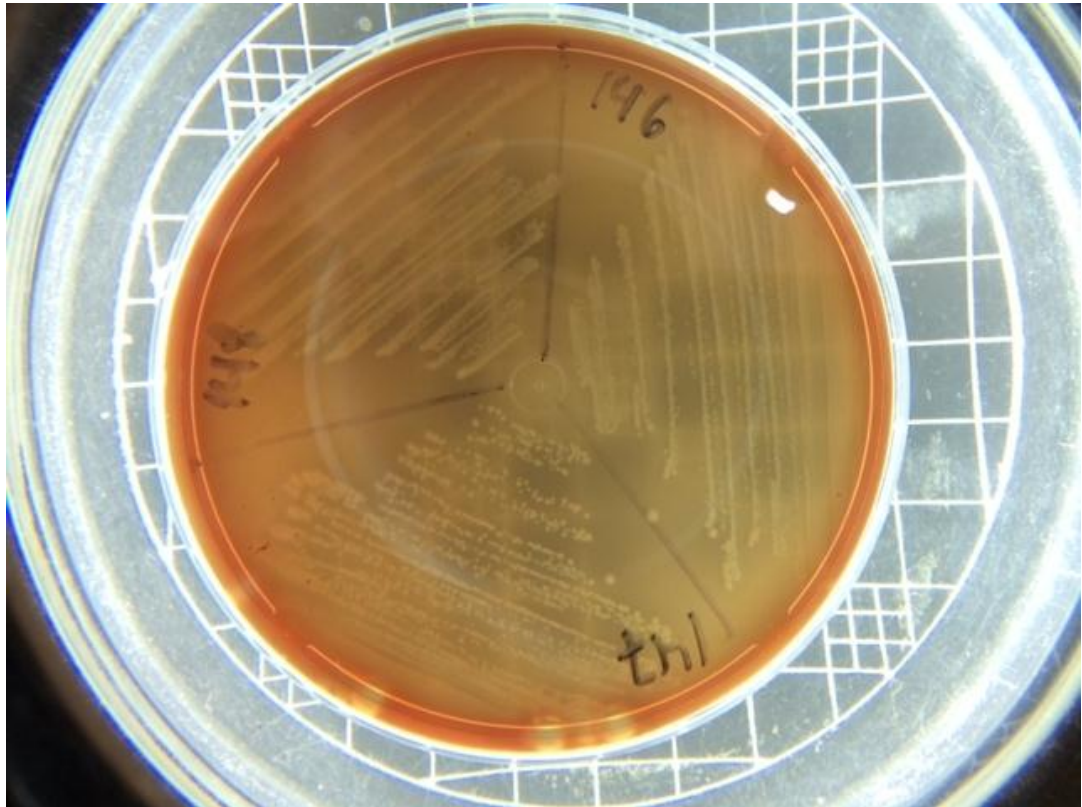
O teste de hemólise em ágar sangue foi realizado a fim de se verificar a presença ou não de atividade hemolítica dos isolados de EAEC. Observamos que 62 isolados 62/108 (57,4%) apresentaram atividade hemolítica e 45/108 (41,66%) não apresentaram. Dos 62 isolados que demonstraram um perfil de hemólise, 56/108 (51,85%) foram alfa-hemolíticos e 6/108 (5,55%) beta-hemolíticos (tabela 13).

Tabela 13- Resultado do teste de hemólise dos isolados de EAEC.

Hemólise	Cepas	%
Total Beta-β	6/108	5,55
Parcial Alfa-α	56/108	51,85
Não hemolítico- γ	44/108	40,74
Indefinido	4/108	3,70

A figura 18 representa uma de nossas placas de ágar-sangue que demonstra perfil positivo para presença de hemólise do tipo parcial (alfa-hemólise), nas cepas 146, 147 e 148.

Figura 128- Alfa Hemólise das amostras 146, 147 e 148



5 DISCUSSÃO

EAEC é um patógeno causador de diarreia aguda principalmente em crianças de 0 a 6 anos de idade em países em desenvolvimento e desenvolvidos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A patogênese por EAEC ocorre em três estágios. Inicialmente ocorre uma adesão do microorganismo à mucosa intestinal e o aumento da produção de muco (1), em seguida ocorre a elaboração de enterotoxinas, e citotoxinas promovendo a toxicidade das mucosas do trato gastrointestinal (2) e finalmente ocorre o processo inflamatório (3). (HUANG et al., 2004). Nesta pesquisa utilizamos 108 amostras de EAEC previamente identificadas e armazenadas no laboratório de microbiologia do CEPEN.

Em relação aos testes de antimicrobianos dos isolados de EAEC, observamos alta frequência de resistência a ampicilina 64,8%, trimetoprim-sulfametoxazol 54,6% e tetraciclina 45,3%. Segundo Kahali et al (2004), a maioria das EAEC isoladas apresentam resistência às ampicilinas de 86,80%. Em estudos realizados por Presterl e colaboradores (2003), os isolados de EAEC que exibiram menor sensibilidade foram: ampicilina 32%, tetraciclina 25% e trimetoprim 42% (PRESTERL *et al.*, 2003). Segundo as pesquisas realizadas por Régua-Mangia (2009), as bactérias apresentaram maior resistência ao sulfametoxazol 50,8%, ampicilina 46,1%, ceftazidima 13,8%, ceftriaxona 12,3% e amicacina 9,2% (RÉGUA-MANGIA, 2009); (RODRIGUES, 2013 apud VILA; PAL, 2010).

No presente estudo os antibióticos que apresentaram maior sensibilidade foram a amicacina com 98,0%, imipenem com 94,4%, ceftazidima com 91,6%, piperaciclina+tazobactam com 87,9%, gentamicina com 86,1% (tabelas 14 e 15). Estes resultados são semelhantes aos achados por Kahali et al (2004) que obtiveram sensibilidade para amicacina; ceftazidima e gentamicina.

A partir dos trabalhos de Huang et al 2004 citado por Infante em 2004, os antibióticos recomendados para o tratamento de diarreia por EAEC são: fluoroquinolonas, azitromicina, rifaximina, amoxicilina, ácido clavulânico e ácido nalidíxico.

Em um trabalho de Kahali et al., (2004), os antimicrobianos que apresentaram maior sensibilidade nas EAEC foram gentamicina 90.1%, amicacina 78.5% e ceftriaxona 68.6%. Já os antimicrobianos que apresentaram maior

resistência foram: Ampicillina 86.8%, ácido nalidixico 84.3% e tetraciclina 79.3% (KAHALI et al., 2004).

Segundo os autores o aumento da resistência aos antibióticos foi devido a uma transferência da resistência aos antibióticos através de conjugação, provavelmente codificados por um plasmídeo (PRESTERL et al., 2003 apud OKEKE et al., 2000); (GREENBERG, 2002). A resistência mais comum aos antibióticos em EAEC ocorre na maioria das vezes sobre as ampicilinas e do sulfametoxazol (RODRIGUES, 2013). Existem ainda cepas com a característica de multiresistência aos antibióticos. Este resultado é preocupante uma vez que a emergência de cepas resistentes aos antimicrobianos diminui as opções terapêuticas. Isolados de EAEC foram encontrados em 57 de 150 crianças do Gabão entre 6 a 24 meses de idade. Estas EAEC exibiram aumento da resistência contra o padrão de antibióticos, tais como ampicilina, tetraciclina, trimetoprim (PRESTERL, 2003).

Em outros países, a prevalência de ESBL pelos métodos fenotípicos apresentam variações que vão de 20 a 67% (OLIVEIRA et al., 2009 apud CARTER 2000); (JEONG, 2004); (MULVEY, 2004); (SANGUINETTI, 2003). As taxas de prevalências de ESBL em *E. coli* são variadas no mundo. Dados obtidos de SENTRY Antimicrobial Surveillance Program informam variações nesses índices: América Latina = 8,5%, Canadá = 4,2%, EUA = 3,3%, Europa = 11,1%, para o Brasil, a prevalência dos isolados que produzem ESBL= 9,1%. Neste estudo a identificação de ESBL pelo teste fenotípico (método do disco combinado) foram confirmadas como positivas em 16,6% dos isolados e 83,3% das amostras foram consideradas negativas (tabela 16).

Os isolados de ESBL positivos foram analisados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação dos genes *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}*.

Essas taxas podem variar de região para região e mesmo de um hospital para o outro, os percentuais brasileiros são superiores aos de outras regiões do mundo (MARTINS; PICOLI, 2011). Vários fatores complicadores favorecem o aumento da síndrome diarréica, dentre os principais destacam-se o baixo nível de escolaridade destas populações, condições precárias de higiene pessoal e doméstica, ausência de tratamento do lixo adequado do lixo e dos dejetos, fornecimento inadequado de água e acesso mais difícil à rede de saúde pela população menos favorecida (BLACK; EMERSON; RAHNAN; YUNIS; ALIM, 1980).

Neste estudo a detecção molecular dos genes codificadores das enzimas ESBL do tipo *bla-tem* foi detectada em 24,07% das amostras e os do tipo *bla-ctx-m* em 12,03%. A presença destes genes de resistência também foi detectada na Espanha, França e no Reino Unido, bem como em países asiáticos, Japão, China, de Taiwan, Coréia, e do Vietnã e Brasil (EDELSTEIN et al., 2003). Uma pesquisa realizada em dois hospitais na cidade de Saxony na Alemanha o ano de 2006, a presença do gene *bla-tem* foi observada em 30,7% das amostras.

Neste estudo, a associação entre os genes ESBL do tipo TEM e CTX-M com o teste fenotípico para a detecção de ESBL mostrou que o fenótipo de ESBL e a presença de *bla-tem* foi de 5,55%, enquanto que o fenótipo de ESBL e a presença de *bla-ctx-m* foi de 1,85% das cepas pesquisadas (tabela 17). Em um estudo realizado na Rússia em diversos hospitais, o mesmo descreve a presença do gene *bla-ctx-m* em 35,9% das amostras, estes resultados demonstraram, pela primeira vez, a elevada proporção de enzimas *bla-ctx-m* de várias cepas de ESBL nosocomiais em hospitais russos (EDELSTEIN et al., 2003).

A disseminação destes genes de resistência deve estar ligada a surtos e epidemias clonais e produção de novas linhagens em cidades geograficamente distantes, além da propagação clonal das cepas, a transferência de plasmídeo desempenha um papel importante na disseminação mundial de *bla-ctx-m* em áreas nosocomiais. Os achados percentualmente superiores do gene *bla-tem* devem estar ligados a sua distribuição espacial desigual (RODRIGUES, 2013).

Não só adesinas e toxinas têm sido descritas em EAEC, mas sim muitos outros fatores de virulência produzidos, alguns codificados em genes localizados em plasmídeos e outros nos cromossomos de amostras (WEINTRAUB, 2007).

Em um trabalho realizado na Índia com 1826 pacientes internados com diarreia no Hospital de Doenças Infecciosas em Calcutá, detectou-se a presença de cepas de EAEC em 121 amostras (6,6%) analisadas que apresentaram diarreia aquosa e foram mais frequentes nas crianças (KAHALI et al., 2004).

A identificação dos genes de virulência plasmidial e cromossômico através de pcr foi pesquisada e observamos os seguintes valores em ordem decrescente de aparecimento: *irp2* 71,30%; *astA* 62,96%; *aggR* 48,15%; *aatA* 38,90%; *set1A* 37,96%; *afa1* 36,11%; *shf* 34,26%; *pic* 17,60%; e *pet* 7,40%. Comparamos os resultados obtidos na atual pesquisa com a pesquisa de Kahali et al., (2004) realizada na Índia em 121 isolados de EAEC obtendo-se as prevalências de *irp2*

(47,9%); *astA* (29,8%); *aggR* (65,3%); *afa1* (1,7%); *shf* (65,3%); *pic* (21,6%) e *pet* (30,6%), vide tabela 18 (KAHALI et al., 2004 apud ELIAS, 2002); (OKEKE et al., 2000); (MATHEWSON et al., 1985); (PIVA et al., 2003),

Um trabalho realizado por Lima em 2008 na cidade de Fortaleza com a análise de 83 casos positivos para diarreia, o gene de virulência *asta* foi o mais abundante; *aggR* foi detectado em 47,1%, em nosso trabalho a detecção do gene *aggR* tem frequência praticamente idêntica de 48,15%.

Na Nigéria, Okeke e colaboradores (2004), relataram a presença do gene *aggR* em 100% das amostras (LIMA, 2008).

Em uma pesquisa realizada na África, o gene *asta* que produz a toxina EAST apareceu em 59,6% das amostras, (LIMA, 2008 apud GIOPPO et al., 2000; PRIESTERL et al., 2003); o gene *astA* estava presente em 22,1% das crianças com diarreia na Nigéria e 38,8% no Irã (PRESTERL, 2003 apud OKEKE et al., 2000); (BOUZARI et al., 2005).

Mohamed e Huang & cols. (2006) obtiveram em 40 isolados de EAEC a presença dos genes *irp2* 68%, *set1A* 43%, *aggR* 40% e *aata* 25% (MOHAMED; HUANG; JIANG; DUPONT; NATARO; BELKIND-GERSON; OKHUYSSEN, 2007).

No trabalho de Monteiro (2008), a amplificação dos genes *asta* apareceu em 69,2% das amostras, *shf* 30,7% das cepas e de *irp2* 7,7% dos achados em nossa pesquisa. Tais genes codificam as proteínas EAST-1 e a proteína SHF envolvida na formação do biofilme (MONTEIRO, 2008 apud FUJYIAMA et. al., 2008).

Observou-se que o gene *aggR* associado aos genes *aata*, *astA* e *set1a* e *pet*, foram associados com doença diarreica (CENNIMO, 2008).

Esses resultados mostram a grande heterogeneidade dos genes de virulência presentes nas cepas diarreogênicas de EAEC.

Quando observadas as frequências combinadas dos genes pesquisados, houve associação significativa entre a presença do gene *pet* e diarreia (LIMA, 2008).

As EAEC têm a capacidade de formar biofilmes e foi descrita em uma cultura de biópsia de cólon humano e estão relacionadas com a diarreia persistente, estas bactérias não se aderem individualmente aos intestinos, mas aderem formando aglomerados bacterianos que são comunidades bacterianas aderidas a superfícies vivas (SHEIKH et al., 2001).

Nesta pesquisa o estudo de biofilme nas cepas de EAEC observou-se que 43,51% apresentaram um fenótipo fortemente aderente, 19,44%, fracamente aderentes e 36,11% das amostras foram não-aderentes (tabela 19).

O trabalho de Vasconcelos (2009) apresentou a formação de biofilme em 80,5% formando biofilmes densos altamente aderentes, 19,5% apresentou biofilmes fracamente aderentes, valores praticamente idênticos aos nossos achados. Pereira (2009) afirma em seu estudo da patogênese de EAEC sobre a presença do papel de supostas estruturas de aderência denominados *pili* F na intensificação da adesão e formação de biofilmes simples e mistos, isto é, provenientes de mais de uma espécie bacteriana, na pesquisa acima a espécie estudada foi *Citrobacter freundii* com supostos *pili* F expressos por cepas típicas de EAEC incrementam a formação de biofilmes mistos (PEREIRA, 2009). O fato destes achados mostrarem a existência de cepas formadoras de biofilme é temeroso, pois a formação de biofilmes é um fator de virulência é um mecanismo de resistência da bactéria, tornando esses microorganismos mais resistentes a ação de agentes antimicrobianos (RODRIGUES, 2013 *apud* HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009); (MACEDO, 2000); (NORMARK, 2002).

Quanto aos testes de hemólise em ágar sangue de carneiro, observou-se que 56,48% dos isolados de EAEC apresentaram atividade hemolítica, entre estes, 51,85% foram alfa-hemolíticos e 5,55% beta-hemolíticos (tabela 20). Os resultados obtidos se aproximam dos achado por Navarro-Garcia (2011) que observou alfa-hemólise em 75% das amostras. A presença de amostras de EAEC apresentando atividade hemolítica revela a presença de um vasto repertório de genes de virulência em diversos patótipos. Dentre as toxinas e enzimas mais importantes para o fenômeno de hemólise estão as hemolisinas (α -HlyA), muito comum em *E. coli* enterohemorrágica e uropatogênicas. Esta toxina tem a capacidade de lisar a membrana celular e destruir suas funções, as maiores dessas toxinas citolíticas são importantes fatores de virulência bacteriana. O papel da hemolisina na patogênese das EAEC ainda não foi elucidado.

Em relação ao padrão de aderência em células HEp-2 nossos experimentos mostraram a aderência agregativa em 48,15% das amostras; aderência difusa em 20,37% e aderência localizada em 6,48% (tabela 21).

Estes resultados foram comparados com os realizados por Kahali e cols. (2004), onde foram observados aderência agregativa em 57%, o padrão aderência

difusa em 23,1% e aderência localizada em 5% (KAHALI et al., 2004). Os estudos realizados por Villaseca (2005) mostraram que em 1801 amostras de EAEC analisadas, 256/1801 (14,2%) apresentaram um padrão de aderência agregativa (VILLASECA, *et al.*, 2005 *apud* GOMES, 1991).

O estudo realizado por Pereira (2009) mostrou que o fenótipo de aderência agregativa (AA) esteve associado à presença de plasmídio pAA codificador de fímbrias de aderência agregativa (AAF), sendo esta uma ocorrência de diversos fatores sendo a expressão de adesinas fimbriais, de *pilis* e adesinas afímbriais que não estão relacionadas aos plasmídios de AA. Este ensaio mostrou que a adesão bacteriana nas células epiteliais era intensificada pela co-infecção e um sinergismo com *C.freundii* e cepas de EAEC (PEREIRA, 2009).

A associação entre aderência celular e genes de virulência mostram que a relação adesão-*aggR* apareceu em 27,7%; adesão-*astA* 26,85% e adesão-*aafA* 23,15% das cepas.

CONCLUSÃO

- A resistência bacteriana foi mais proeminente aos antibióticos ampicilina, trimetoprim e tetraciclina;
- A maioria das amostras de EAEC apresentou padrão de atividade hemolítica de alfa-hemólise;
- O fenótipo de resistência teve como resultado mais comum ESBL do tipo ^{bla}TEM com 24,07%;
- Na formação de biofilme a forma fortemente aderente foi a mais comum observada;
- Na capacidade de adesão celular, a aderência agregativa é a mais abundante;
- Os genes de virulência *irp2*; *asta* e *aggr* são os mais comuns nas cepas pesquisadas;
- Os resultados indicam que outros fatores de virulência podem estar envolvidos com o padrão de aderência agregativa.

REFERÊNCIAS

- ALBERT, M.J.; FARUQUE, S.M.; FARUQUE, A.S.; NEOGI, P.K.; ANSARUZZAMAN, M. et al. **Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children.** J Clin Microbiol 33: 973-7.1995.
- ANTÃO, E.M.; WIELER, L.H.; EWERS, C. **Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*.** Gut Pathog 1: 22 2009.
- BEHRENS, M.; SHEIKH, J.; NATARO, J.P. **Regulation of the overlapping pic/set locus in *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*.** Infect Immun 70: 2915-25.2002.
- BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. **Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III encoding operon in enteroaggregative *E. coli* as sensitive probe for detecting the AAF encoding operon family.** 2002.
- BLACK, R.; EMERSON, M.H.; RAHMAN, A.S.; YUNUS, M.; ALIM, A.R, et al. **A two-year study of bacterial, viral, and parasitic agents associated with diarrhea in rural Bangladesh.** J Infect Dis 142: 660-4. 1980.
- BONNET, R. **Growing Group of extended-spectrum β -lactamase CTX-M enzymes.** Antimicrob. Agents Chemother. 2004.
- BOPP, C.A.; BRENNER, F.W.; WELLS, J.G.; STROCKBINE, N.S. ***Escherichia, Shigella and Salmonella*.** In: Manual of Clinical Microbiology 7th edition, Murray, P. R., Baron, E. J., Tenover, F. C. & Tenover, R. H. (Eds), pp. 459-474, ASM Press, ISBN 1555811264, Washington D. C., USA. 1999.
- BOUZARI, S.; JAFARI, M.N.; ZAREPOUR, M. **Distribution of virulence related genes among enteroaggregative *Escherichia coli* isolates: using multiplex pcr and hybridization.** 2005.
- BRAUNER, A.; KATOULI, M.; TULLUS, K.; JACOBSON, S.H. **Cell surface hydrophobicity, adherence to HeLa cell cultures and haemagglutination pattern of pyelonephritogenic *Escherichia coli* strains.** 1990.
- CAMPOS, G.J.; REIS, F.S.A.; SILVA, A.A.; NOVOCHADLO, M.A.; , SILVA, R.A.; GALVÃO, C.E. **Infant morbimortality due to acute diarrhea in a metropolitan area of northeastern Brazil, 1986-1989].** Rev Saúde Pública 29: 132-9. 1995.
- CARTER, M.W.; OAKTON, K.J.; WARNER, M.; LIVERMORE, D.M.; **Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiellae* with the Oxoid Combination Disk Method.** Journal of Clinical Microbiology. 2000.

CASTILHONE, C.A.M. **Enterohemolisina de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica: novas características fenotípicas.** 2007.

CENNIMO, D.J.; ABBAS, A.; HUANG, D.B.; CHIANG, T. **The prevalence and virulence characteristics of enteroaggregative *Escherichia coli* at an urgent-care clinic in the USA: a case-control study.** 2008.

CENTENO, A.J. **Curso de Estatística Aplicada a Biologia.** Livraria Conceito. UFG, 2^a Ed. 1999.

COSTA, A. B. V. **Padronização da reação de *Immuno-dot* para detecção de Pet em sobrenadante de cultura de *Escherichia coli* enteroagregativa.** Dissertação de mestrado, USP. São Paulo, 2004.

CLEMENTS, A.; YOUNG, J.C.; CONSTANTINOU, N.; FRANKEL, G. **Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*.** Gut Microbes 3: 71-87, 2012.

CLSI - **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute** (antigo NCCLS), 2012.

CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; NAVARRO, A.; RUIZ, J.; VILLAFAN, H.; URIBE, F.; ESLAVA, C. **Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea.** Lancet.1991.

CROXEN, M.A.; FINLAY, B.B. **Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity.** Nat Rev Microbiol 8: 26-38, 2010.

CZECZULIN, J. R.; BALEPUR, S.; HICKS, S.; PHILLIPS, A.; HALL, R.; KOTHARY, M. H.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. **Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*.** Infect Immun. 1997.

CZECZULIN, J.R.; WHITTAM, T.S.; HENDERSON, I.R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. **Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*.** Infect Immun 67: 2692-9, 1999.

EDELSTEIN, M, et al. **Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum β -lactamase- Production *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals.** 2003.

ELIAS, W. P.; UBER, A.P.; TOMITA, S.K.; TRABULSI, L.R and GOMES, T.A. **Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea.** Epidemiol. Infect. 2002.

ESPARIS, C.M et al. **Biological and molecular characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated in the City of Rio de Janeiro.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, nov-dez 2006.

FREITAS, A.L.P et al. **Extended Spectrum β -lactamases in *Klebsiella* spp and *Escherichia coli* Obtained in a Brazilian Teaching Hospital Detection, Prevalence and Molecular Typing.** Brazilian Journal of Microbiology, 2003.

FUJYIAMA, R. et. al. **The shf gene of *Shigella flexneri* homologue on the virulence plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation.** Curr. Microbiolog. 2008.

GIOPPO, N.M.; ELIAS, J.R.; VIDOTTO, M.C.; LINHARES, R.E.; SARIDAKIS, H.O.; GOMES, T.A.; TRABULSIN, L.R.; PELAYO, J.S. **Prevalence of Hep-2 cell- adherence *Escherichia coli* and characterization of enteroaggregative *E. coli* and chain-lake adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhea in Londrina, Brazil, 2000.**

GOMES, T.A.; RASSI, V.; MACDONALD, K.L.; RAMOS, S.R.; TRABULSI, L.R et al. **Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in Sao Paulo, Brazil.** J Infect Dis 164: 331-7, 1991.

GORDON, D. C.; ANDREW, S.; JANARA, J Y.; LARRY, M. B.; FRED, F. B.; DENNIS, M.M & EDWIN, H.B. **Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. 1985.**

GREENBERG, D.E.; JIANG, Z.D.; STEFFEN, R.; VERNKER, M.P.; DuPont, H.L. **Markers of inflammation in bacterial diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative. 2002.**

HALL-STOODLEY & STOODLEY P.; **Evolving concepts in biofilm infections;** Cellular Microbiology ; 11(7), p.1034-1043. 2009.

HAQUE, M.S.; OHKI, K.; KIKUCHI, M.; KOHASHI, O. **Contact hemolysin production by strains of enteroaggregative *E. coli*; isolated from children with diarrhea. 1994.**

HARRINGTON, S.M.; DUDLEY, E.G.; NATARO, J.P. **Article first published online. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection.** FEMS Microbiology Letters. 2005.

HARRINGTON, S.M. **Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection.** FEMS Microbiol Lett 254: 12-8, 2006.

HENDERSON, I,R et al. **Caracterização de PIC, uma protease secretada de *Shigella flexneri* e enteroagregativas *Escherichia coli***. Infect. Immun 67, 1999.

HENDERSON, I. J. CZECHULIN, C.; ESLAVA, F.; NORIEGA and NATARO, J. **Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli***. Infect. Immun. 1999.

HUANG, D.B et al. **Am J Gastroenterol**. Department of Medicine, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA. 2004.

HUANG, D.B.; MOHANTY, A.; DuPont, H.L.; OKHUYSEN, P.C and CHIANG, T. **A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli***, 2004.

HUANG, D.B. **A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli***. J Med Microbiol 55: 1303-11, 2006.

HUANG, D.B.; OKHUYSEN, P.C.; JIANG, Z.D.; DUPONT, H.L. **Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen**. Am J Gastroenterol 99: 383-9, 2004.

JEONG, S.H.; BAE, I.K.; LEE, J.H.; SOHN, S.G.; KANG, G.H.; JEON, G.J.; KIM, Y.H.; JEONG, B.C.; LEE, S.H. **Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamases Produced by Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean Nationwide Survey**. Journal of Clinical Microbiology, 2004.

JIANG, Z.D.; OKHUYSEN, P.C.; GUO, D.C.; HE, R.; KING, T.M, et al. **Genetic susceptibility to enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhea: polymorphism in the interleukin-8 promotor region**. J Infect Dis 188: 506-11, 2003.

JOHNSON, J.R.; MANGES, A.R.; O'BRYAN, T.T.; RILEY, L.W. **A disseminated multidrug-resistant clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* in pyelonephritis**. Lancet. 2002.

KAHALI, S.; RAJENDRAN, B.S.; JASMINA, K.; YAMASAKI, S.; RANJAN, K.; NANDY, S.; BHATHATTACHARYA, K.; RAMAMURTHY, T. **Virulence Characteristics and Molecular Epidemiology of Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolates from Hospitalized Diarrheal Patients in Kolkata, India**. * JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, p. 4111–4120 Vol. 42, No. 9 . American Society for Microbiology. All Rights Reserved. 2004.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. **Pathogenic *Escherichia coli***. Nat Rev Microbiol 2: 123-40, 2004.

KHAN, M.A.; STEINER, T.S. **Mechanisms of Emerging Diarrheagenic *Escherichia coli* Infection**. Curr Infect Dis Rep 4: 112-7, 2002.

KNUTTON, S.; SHAW, R.K.; BHAN, M.K.; SMITH, H.R.; McCONNELL, M.M, et al. **Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa.** Infect Immun 60: 2083-91, 1992.

KRONENBERG, D. M. P.; JÚNIOR, J. C. **Análise dos Impactos na Saúde e no Sistema único de Saúde Decorrentes de Agravos Relacionados ao Esgotamento Sanitário Inadequado nos Municípios Brasileiros com mais de 300.000 Habitantes.** Instituto Trata Brasil. 2010.

LIMA, I.F.N. **Genes Codificadores de Fatores de Virulência, Inflamação e Avaliação Nutricional da Infecção Intestinal Associada em *Escherichia coli* enteroagregativa em crianças de Fortaleza, Ceará, Brasil.** 2008.

MACEDO, J.A.B. **Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria farmacêutica;** Revista Fármacos e medicamentos; v. 2; nº 7; p. 19-24; Nov/Dez, 2000;

MAGALHÃES, C.A. et al. **The ability of haemolysins expressed by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* to bind to extracellular matrix components.** Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil 2011.

MARTINS, A.C.; PICOLI, S.U. **Métodos alternativos para detecção de betalactamase de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.** J. Bras. Med. Lab, vol. 47, 2011.

MATHEWSON, J.J.P.C.; JOHNSON, H. L.; DUPONT, D. R.; MORGAN, S.A.; THORNTON, L.V.W and Ericsson, C.D. **A newly recognized cause of travelers' diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*.** J. Infect. Dis, 1985.

MENARD, L.P.; DUBREUIL, J.D. **Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist.** Crit Rev Microbiol 28: 43-60. 2002.

MOHAMED, J.A.; HUANG, D.B.; JIANG, Z.D.; DUPONT, H.L.; NATARO, J.P.; BELKIND-GERSON, J.; OKHUYSEN, P.C. **Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries.** J Clin Microbiol 45: 121-6, 2007.

MONTEIRO, B.T. **Caracterização da proteína dispersina em amostras de *e. coli* não pertencentes ao patótipo de *E. coli* enteroagregativa.** Dissertação USP, 2008.

MORIN, N.; SANTIAGO, A.E.; ERNST, R.K.; GUILLOT, S.J.; NATARO, J.P. **Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*.** Infect Immun 81: 122-32, 2013.

MULVEY, M.R.; BRYCE, E.; BOYD, D.; OFNER-AGOSTINI, M.; CHRISTIANSON, S.; SIMON, A.E.; PATON, S. **The Canadian Hospital Epidemiology Committee of the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, Health Canada. Ambler Class A Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian Hospitals.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48: 1204-1214, 2004.

NATARO, J.P.; DENG, Y.; COOKSON, S.; CRAVIOTO, A.; SAVARINO, S.J.; GUERS, M.M.; LEVINE & TACKET, C.O. **Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers.** J. Infect. Dis. 1995.

NATARO, J.P. **C1096 to Cultured Cells and Abiotic Enteroaggregative *Escherichia coli* Strain Adherence of the Atypical *inc11* Plasmid Contributes to the Surface.** Infection and Immunity, 2006.

NATARO, J.P. **Enteroaggregative *Escherichia coli*, Emerging Infectious Diseases, Synopses,** 1998.

NATARO J.P.; KAPER, J.B. **Diarrheagenic *Escherichia coli*.** Clin Microbiol Rev. Department of Medicine, University of Maryland School of Medicine, Baltimore. 1998.

NATARO J.P. **Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis.** Gastroenterol. 2005.

NAVARRO-GARCIA, F. **O plasmídeo: toxina codificada de enteroagregativa *Escherichia coli* é internalizada pelas células epiteliais.** Infect. Immun . 69, México, 2001.

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W.P. **Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*.** Gut Microbes 2: 13-24, 2011.

NAVEEN, R.; MATHAI, E. **Some virulence characteristics of uropathogenics *Escherichia coli* in different patient groups.** The Indian Medical Group, 2005.

NETO, U.F. **Gastroenterologia Pediátrica.** Rev. 2010.

NORMARK, B.H.; & NORMARK, S.; **Evolution and spread of antibiotic resistance; Journal of internal Medicine; 252; 91-106; 2002.**

OKEKE, I.N.; LAMIKANRA, A.; STEINRUCK, H.; KAPER, J.B. **Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial southwestern Nigeria.** J Clin Microbiol. 2000.

OKEKE, I.N.; Lamikanra A, Czeizulin J, Dubovsky F, Kaper JB, Nataro JP. **Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in southwest Nigeria.** J Infect Dis 181: 252–260. 2000.

OKEKE, I.N. Scaletsky I.C.A., Soars E.H, Macfarlane L.R. Torres A.G. **Molecular Epidemiology of the Iron Utilization Genes of Enteroaggregative *Escherichia coli***. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. Department of Biomedical Sciences, University of Bradford, Bradford, United Kingdom. 2004.

OLIVEIRA, C.F.; DAL FORNO, N.L.; ALVES, I.A.; HORTA, J.A.; RIEGER, A.; ALVES, S.H.; **Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de β -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul**; Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2009.

ORLANDI, P.P.; SILVA, T.; MAGALHÃES, G.F.; ALVES, F.; CUNHA, R, P, A.; DURLACHER, R.; SILVA, L, H, P. **Enteropathogens Associated with Diarrheal Disease in Infants of Poor Urban Areas of Porto Velho, Rondônia**. Instituto Oswaldo Cruz, 2001.

ORLANDI, P.P. **Estudo sobre virulência de bactérias patogênicas: 1. Estudo epidemiológico molecular de enterobactérias em Rondônia; 2. Mecanismos de virulência associados ao Quorum Sensing em *Pseudomonas aeruginosa***. Tese, USP, 2003.

ORLANDI, P.P.; MAGALHÃES, G.F.; MATOS, N.B.; SILVA, T.; PENATTI, M.; NOGUEIRA, P.A.; PEREIRA, S. L. H. **Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondônia, western Amazon region, Brazil)**. Braz J Med Biol Res 39-507-517), 2006.

PATERSON, D.L.; BONOMO, R.A. **Extended Spectrum β -lactamase**. Clinical Review, 2005.

PEREIRA, A.L. **Patogênese de *E. coli* enteroagregativa: Papel dos supostos pili F na intensificação por biofilmes e na formação de células Hela**. Universidade de Brasília. 2009.

PFALLER, M.A.; SEGRETÍ, J. **Overview of the epidemiological Profile and Laboratory Detection of Extended Spectrum β -lactamses**. Clinical Infectious Diseases 2006.

PIVA, I. C.; PEREIRA, A.L; FERRAZ, L.R; SILVA, R.S; VIEIRA, J. E; BLANCO, M; BLANCO, J and GIUGLIANO, L.G. **Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasilia, Brazil**. 2003.

PRESTERL, E. et al. **FREQUENCY AND VIRULENCE PROPERTIES OF DIARRHEAGENIC *Escherichia coli* IN CHILDREN WITH DIARRHEA IN GABON**. Department of Medicine I, Division of Infectious Diseases, University of Vienna, Vienna, Austria; MedicalResearch Unit, Albert Schweitzer Hospital, Lambare´ne´,

Gabon; Department of Parasitology, Institute for Tropical Medicine, University of Tuebingen, Tuebingen, Germany, 2003.

RÉGUA-MANGIA, A.H. ***Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC): filotipagem e resistência a antimicrobianos em um enteropatógeno emergente.** 2009.

RITENBERG, M.K.S.; GANIN, H.; MEIJLER, M.M, RAZ, J. **Biofilm Formation on Chromatic Sol–Gel/Polydiacetylene Films.** Chem PlusChem 77: 752, 2012.

RODRIGUES, R.S. **Caracterização das cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica (epec) típica e atípica isoladas de crianças com gastroenterite aguda na região de Porto Velho-Ro.** Dissertação de mestrado. UNIR, 2013.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; SPANU, T.; CICCAGLIONE, D.; ROMANO, L, FIORI, B.; NICOLETTI, G.; ZANETTI, S.; FADDA, G. **Characterization of Clinical Isolates of Enterobacteriaceae from Italy by the BD Phoenix Extended-Spectrum β -Lactamase Detection Method.** Journal of Clinical Microbiology, 2003.

SAVARINO, S.J, et al. **De *Escherichia coli* enteroagregativa enterotoxina termoestável 1 representa outra subfamília de E. coli toxina termo-estável.** Proc. Natl . Acad . Sci . EUA. 1993.

SERVIN, A.L. **Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*.** Clin Microbiol Rev. 2005

SHARMA et al., ***Escherichia coli*: Pathotypes and Principles of Pathogenesis.** 2010.

SHEIKH, J.; HICKS, S.; DALLAGNOL, M. **Roles for Fis and Yafk in biofilm.** 2001.

SHEIKH, J.; HEIKH, J.; HICKS, S.; DALLAGNOL, M.; PHILLIPS, A. D & NATARO, J. P. **et al. HEp-2 cell-adherence assay.** Journal of Medical Microbiology , 2001.

SIEGFRIED, L. **Bacteriologia, um texto ilustrado.** Ed. Eventos, Teresópolis/RJ, 1999.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. **Biofilms as complex differentiated communities.** Annu Rev Microb., v 56, p. 187-209,2002.

STURENBURG, E.; MACK, D. **Extended- spectrum B- lactamases: implications for the clinical laboratory, therapy, and infection control.** J. Infect. 2003.

SUZART, S.; GUTH, B.E.; PEDROSO, M.Z.; OKAFOR, U.M.; GOMES, T.A. **Diversity of surface structures and virulence genetic markers among**

enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains with and without the EAEC DNA probe sequence. FEMS Microbiol Lett 201: 163-8, 2001.

THEA, D.M. & KEUSCH, G.T. **Digestive System.** In: **Schaechter, M.; Medoff, G.; Eisenstein, B.I. Eds. Mechanisms of Microbial Disease.** Baltimore, Williams & Wilkins, p. 695-715, 1993.

TOKUDA, K.; NISHI, J.; IMUTA, N.; FUJIYAMA, R.; KAMENOSONO, A et al. **Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in KAGOSHIMA, J. biofilm formation and acid resistance.** Microbiol Immunol 54: 320-9. 2010.

TORNIEPORTH, N.G.; JOHN, J.; SALGADO, K.; DE JESUS, P.; LATHAM, E et al. **Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR.** 1995.

VASCONCELLOS, F.M. **Padrão de adesão agregativa e formação de biofilme em *Escherichia coli* enteroagregativa típica e atípica: papel da proteína Shf.** USP.Instituto de Ciências Biomédicas. São Paulo. 2009.

VIDAL, J.E.; CANIZALEZ-ROMAN, A.; GUTIERREZ-JIMENEZ, J.; NAVARRO-GARCIA, F. **Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*.** Salud Publica Mex 49: 376-86, 2007.

VILLASECA, J.M.; HERNANDEZ, U.; SAINZ-ESPUNES, T.R.; ROSARIO, C.; ESLAVA, C. **Enteroaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties.** Rev Latinoam Microbiol 47: 140-59, 2005.

WEINTRAUB, A. **Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection.** Karolinska Institute, Department of Laboratory Medicine, Division of Clinical Bacteriology, Karolinska University Hospital, Huddinge, 14186 Stockholm, Sweden. 2007.

WHOLLEIN, C. **Epidemiologia molecular de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp produtoras de betalactamases de espectro ampliado.** Tese Univ. Caxias do Sul. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS).** AIDS Epidemic Update June 2008. Geneva: UNAIDS/WHO; 2008.

WHO, **World Health Organization;** Disponível em:< <http://www.who.int/topics/diarrhoea/en/>> Acessado em: 20/03/2013.

WROBLEWSKA-SENIUK, K. **Selvarangan R, Hart A, Pladzyk R, Goluszko P, et al. 2005. Dra/AfaE adhesin of uropathogenic Dr/Afa+ *Escherichia coli* mediates mortality in pregnant rats.** Infect Immun 73: 7597-601, 2005.

ANEXOS

ANEXO I – TCLE



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O seu filho está sendo convidado como voluntário a participar da pesquisa:
Caracterização etiológica e molecular dos vírus associados à gastroenterite em crianças de 0 a 6 anos de idade na região na Porto Velho-RO.

A doenças diarréica aguda é umas das principais causas de morte em crianças menores de 6 anos de idade. Os rotavírus e adenovírus, astrovírus e norovírus são os agentes mais implicados com quadros de diarréias graves. Por isso convidamos o responsável pelo menor a participar deste estudo que tem como objetivo avaliar a presença desses vírus nas crianças com diarréia internada nesta unidade hospitalar, para que medidas adequadas em relação ao tratamento sejam adotadas. As amostras de fezes serão coletadas através de evacuações espontâneas diretamente da fralda, após autorização dos pais ou responsável que irá preencher e assinar uma ficha com dados pessoais e clínicos da criança. O estudo não acarretará qualquer risco ou prejuízo para a criança ou seus responsáveis. O resultado do exame estará disponível dentro de 24 horas a partir da coleta e será encaminhado ao médico responsável pelo atendimento da criança para auxiliar no diagnóstico. A criança não será identificada em nenhum momento do estudo e as informações serão guardadas em sigilo e apenas os dados do estudo serão divulgados. O responsável tem o direito de receber informações adicionais sobre o andamento do estudo em qualquer momento no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Porto Velho-RO, sendo livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no

Laboratório de Microbiologia do CEPEN, e outra será fornecida ao responsável pela criança.

Estou ciente de que a participação do meu filho (a) é voluntária e que se eu preferir não participar ou deixar de participar deste estudo em qualquer momento, isso não acarretará qualquer tipo de penalidade. Eu, _____, Responsável pelo menor li e ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento meu filho será submetido. A explicação que recebi esclarece os objetivos, riscos e benefícios do estudo. Portanto sei que o nome do meu filho não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.

Porto Velho...../...../.....

 Assinatura do responsável legal
 Identidade

Documento de

 Impressão Digital

 Assinatura do pesquisador responsável

Telefone e e-mail do pesquisador : (69)3219-6019/32264882/najla_matos@yahoo.fr

(69) 3219-6019/ 32259881/ sandra.amarall@hotmail.com 68

ANEXO II – TABELAS DE CONTINGÊNCIA

		OBSERVADO		
		presente	ausente	total lateral
Caso Controle (-)	Resist. Amp + TEM	23	3	26
	Sens. Amp+ TEM	47	35	82
	sub-total	70	38	108 total

		ESPERADO		
		presente	ausente	total lateral
Caso Controle (-)	Resist. Amp + TEM	17	9	26
	Sens. Amp+ TEM	53	29	82
	sub-total	70	38	108 total

$$\chi^2 = 0,004579921$$

		OBSERVADO		
		presente	ausente	total lateral
Caso Controle (-)	Ader.+aggR	30	10	40
	Não Ader. + aggR	22	46	68
	sub-total	52	56	108 total

		ESPERADO		
		presente	ausente	total lateral
Caso Controle (-)	Ader.+aggR	19,26	20,74	40
	Não Ader. + aggR	32,74	35,26	68
	sub-total	52	56	108 total

$$\chi^2 1,843E-05$$

		OBSERVADO		
		presente	ausente	total lateral
caso	biofi + Irp	51	17	68
controle(-)	Sem biof.+ irp	26	14	40
	sub-total	77	31	108

		ESPERADO		
		presente	ausente	total lateral
caso	biofi + Irp	48,48	19,52	68
controle(-)	Sem biof.+ irp	28,52	11,5	40
	sub-total	77	31	108 total

$$\chi^2 \quad 0,268878$$

		OBSERVADO		
		presente	ausente	total lateral
caso	Esbl+ tem	6	8	14
controle(-)	Sem esbl+tem	20	74	94
	sub-total	26	82	108 total

		ESPERADO		
		presente	ausente	total lateral
caso	Esbl+ tem	3,37	10,63	14
controle(-)	Sem esbl+tem	22,63	71,37	94
	sub-total	26	82	108 total

$$\chi^2 \quad 0,078015975$$

OBSERVADO

caso controle(-)		presente	ausente	total lateral
	Esbl+ctx	2	12	14
	Sem esbl+ctx	11	83	94
	sub-total	13	95	108 total

ESPERADO

caso controle(-)		presente	ausente	total lateral
	Esbl+ctx	1,685	12,315	14
	Sem esbl+ctx	11,315	82,685	94
	sub-total	13	95	108 total

χ^2 0,781524058

OBSERVADO

caso controle(-)		presente	ausente	total lateral
	Resis AMP + ctx+	9	61	70
	Sens. AMP + ctx	4	34	38
	sub-total	13	95	108 total

ESPERADO

caso controle(-)		presente	ausente	total lateral
	Resis AMP + ctx+	8,43	61,58	70
	Sens. AMP + ctx	4,57	33,43	38
	sub-total	13	95	108 total

χ^2 0,723868049

OBSERVADO

caso controle(-)		presente	ausente	total lateral
	RESIST.AMP + hemo+	40	30	70
	Sensi.AMP + hemo	21	17	38
	sub-total	61	47	108 total

ESPERADO

caso controle(-)		presente	ausente	total lateral
	RESIST.AMP + hemo+	39,54	30,46	70
	Sensi.AMP + hemo	21,46	16,54	38
	sub-total	61	47	108 total

χ^2 0,851696713

APÊNDICE

APÊNDICE I - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

- Coletar 1,5 ml do caldo LB com a bactéria em Eppendorf e centrifugar a 12.000 RPM durante 10 minutos.
- Ressuspender o pellet em 300µl de tampão TEN (Tris 0,05M; EDTA 0,05M; NaCl 0,10M), adicionar 30µl de lisozima (20mg/ml) e incubar por 30 min a temperatura ambiente.
- Adicionar 50µl de Triton X-100 a 10% e 20 µl de NaCl 3M, e em seguida aquecer a 60°C em banho-seco, por 5 minutos. Resfriar deixando a temperatura ambiente.
- Adicionar 3µl de RNase (10mg/ml) e incubar a 37°C por 30 minutos.
- Adicionar 50µl de SDS 10% e homogeneizar bem;
- Adicionar 3µl de proteinase K (10mg/ml) e incubar a 37°C por 30 min;
- Adicionar 400µl de fenol, agitar por 5 min (sem auxílio de Vortex);
- Centrifugar a 12.000 RPM durante 10 min. Recuperar o sobrenadante e transferir para um novo eppendorf;
- Adicionar 400µl de Clorofórmio e agitar por 5 min (sem auxílio de Vortex);
- Centrifugar a 12.000 RPM durante 10 min;
- Recuperar o sobrenadante, trocar de eppendorf, adicionar 40µl de NaCl 3M e vagarosamente 1ml de etanol 100%, em seguida centrifugar por 10 min;
- Descartar o sobrenadante, ressuspender sedimento em 1ml de etanol 70%, e centrifugar novamente durante 10 min;
- Secar o sedimento no fluxo laminar.
- Redissolver o sedimento em 200µl de tampão TE e estocar a -20°C.

APÊNDICE II- PROTOCOLO DE DETECÇÃO DE BIOFILME POR ESPECTROFOTOMETRIA

PROTOCOLO DE DETECÇÃO DE BIOFILME POR ESPECTROFOTOMETRIA 1º DIA – CULTIVO BACTERIANO

1. Cultivar as cepas a serem testadas, o controle positivo (EAEC 042) em 3ml de caldo LB;
2. Incubar as amostras cultivadas em estufa bacteriológica a 35°C durante o período de 18 a 24 horas;

2º DIA – PROCEDIMENTOS PARA A FORMAÇÃO DE BIOFILME

1. Retirar da estufa bacteriológica as amostras cultivadas em caldo LB;
2. Pegar uma alíquota das amostras contidas no caldo LB (cerca de 50-75µl) e colocar em solução salina (soro fisiológico) até que as mesmas estejam na escala de 0,5 Mac Farland; OBS: Não esquecer o controle positivo (EAEC 042);
3. Quando as cepas a serem testadas estiverem na escala de 0,5 Mac Farland, deve-se retirar 1µl desta solução e colocá-la em 1,5 ml de caldo LB estéril, a fim de se obter uma concentração aproximada de 100.000 UFC/ml.
4. Deve-se fazer um espelho da microplaca utilizada (96 poços) a fim de se obter a informação correta quanto a localização de cada amostra.
5. Distribuir 200µl desta solução diluída nos poços da microplaca em triplicata.
6. Incubar a microplaca em estufa bacteriológica a 35°C por um período de 18 a 24 horas;

3º DIA – QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME

1. Retirar a microplaca da estufa bacteriológica;
2. Aspirar o conteúdo de cada poço contendo a amostra com o auxílio de uma P-200µl;
3. Lavar 4 vezes cada poço utilizado com 200µl de PBS. Não se deve homogeneizar a amostra com a pipeta, deve-se utilizar o agitador Kline por um período de 1 a 2 min.
4. Secar a microplaca em estufa a 60°C por 1 hora;

5. Lavar a microplaca 4 vezes com água de torneira com o auxílio de uma P-200 e inverter a microplaca para a retirada da água (utilizar o agitador Kline por um período de 1 a 2 min).
6. Adicionar 200µl de SDS a 1% em cada poço, e aguardar cerca de 15 min para a leitura da microplaca;
7. Realizar a leitura da microplaca em espectrofotômetro em comprimento de onda de 640nm;

A intensidade de cor azul/violeta nos poços da microplaca indica aderência bacteriana. Esta aderência pode ser agrupada em 3 categorias: Não aderente, Fracamente aderente ou Fortemente aderente conforme apresentado na tabela abaixo.

Não Aderente	D.O. $\leq 0,120$ nm
Fracamente Aderente	D.O. 0,121 a 240 nm
Fortemente Aderente	D.O. $\geq 0,240$ nm

